






**Methods for in vivo delivery of biologics and compositions useful therefor****Publication number:** CN1118136**Publication date:** 1996-03-06**Inventor:** GRINSTAFF MARK W (CH); SOON-SHIONG PATRICK (CH); WONG MICHAEL (CH)**Applicant:** CLOVER CONS LTD (CH)**Classification:****- international:** A23L1/29; A61K9/00; A61K9/50; A61K9/51; A61K47/30; A61K47/48; A61K49/00; A61K49/04; A61K49/18; A61K49/22; A61K51/00; A23L1/29; A61K9/00; A61K9/50; A61K9/51; A61K47/30; A61K47/48; A61K49/00; A61K49/04; A61K49/06; A61K49/22; A61K51/00; (IPC1-7): A61K9/48**- European:** A61K9/00M5F; A23L1/29F; A61K9/50H6H; A61K9/51; A61K47/48W8; A61K47/48W8D; A61K49/18; A61K49/18P; A61K49/18P8; A61K49/22P; A61K49/22P4; A61K49/22P12; Y01N2/00**Application number:** CN19941091236 19940222**Priority number(s):** US19930023698 19930222; US19930035150 19930326**Also published as:** WO9418954 (A1)  
 EP0693924 (A1)  
 US5498421 (A1)  
 EP0693924 (A4)  
 EP0693924 (A0)

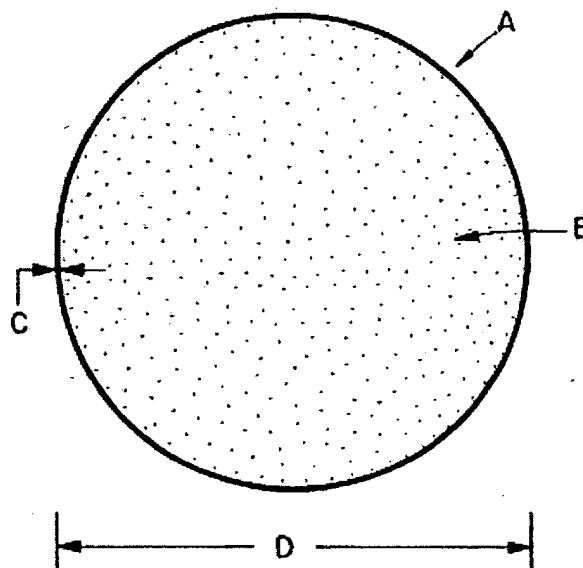
more &gt;&gt;

Report a data error here

Abstract not available for CN1118136

Abstract of corresponding document: **WO9418954**

In accordance with the present invention, there are provided compositions useful for the in vivo delivery of a biologic, wherein the biologic is associated with a polymeric shell formulated from a biocompatible material. The biologic can be associated with the polymeric shell itself, and/or the biologic, optionally suspended/dispersed in a biocompatible dispersing agent, can be encased by the polymeric shell. In another aspect, the biologic associated with polymeric shell is administered to a subject, optionally dispersed in a suitable biocompatible liquid.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

108

[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1118136A



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94191236.1

[51]Int.CI<sup>6</sup>

A61K 9/48

[43]公开日 1996年3月6日

[22]申请日 94.2.22

[30]优先权

[32]93.2.22 [33]US[31]08/023,698

[32]93.3.26 [33]US[31]08/035,150

[86]国际申请 PCT/US94/01985 94.2.22

[87]国际公布 WO94/18954 英 94.9.1

[85]进入国家阶段日期 95.8.21

[71]申请人 维沃RX药物公司

地址 美国加利福尼亚

[72]发明人 马克·W·格瑞恩斯达夫

帕特里克·树恩雄 迈克尔·王

保罗·A·桑福德

肯尼思·S·沙斯利克

内尔·P·迪塞

[74]专利代理机构 北京市中原信达知识产权代理公  
司

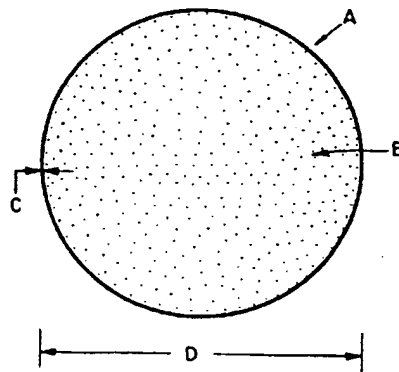
代理人 王达佐

权利要求书 7 页 说明书 96 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 用于体内传送生物制品的方法及用于该方法的组合物

[57]摘要

本发明提供了用于体内传送生物制品的组合物,其中生物制品与由生物相容材料制备的聚合物外壳相结合。该生物制品可以与聚合物外壳本身相结合,和/或生物制品选择性地悬浮/分散于生物相容的分散剂中,被聚合物外壳所包裹。另一方面,把与聚合物外壳相结合的生物制品给某主体给药,可以是分散在一种合适的生物相容液体中给药。



(BJ)第 1456 号

## 权利要求书

---

1. 一种用于体内传送生物制品的组合物,其中所述的生物制品选自:

一种固体,任意分散于一种生物相容分散剂中,它基本上完全被包裹在一种聚合物外壳中,

一种液体,任意分散于一种生物相容分散剂中,它基本上完全被包裹在聚合物外壳中,

一种气体,任意分散于一种生物相容分散剂中,它基本上完全被包裹在聚合物外壳中,

一种与聚合物外壳结合的气体,或它们任何两种或多种的组合,

其中所述外壳的最大截面直径不大于约 10 微米,其中所述的聚合物外壳含有一种基本上是通过二硫键方式交联的生物相容材料,和其中所述的聚合物外壳任意被某合适的试剂修饰,其中所述的试剂任意与所述的聚合物外壳通过一种任意地共价键相连。

2. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述的聚合物外壳,包括与之相结合的固体、液体或气体,适合用作血液代用品。

3. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述的生物制品是选自药物活性试剂、诊断试剂或营养试剂。

4. 根据权利要求 3 的组合物,其中所述的药物活性试剂是选自止痛剂,麻醉剂,抗喘剂,抗生素、抗抑制剂、抗糖尿病

药,抗真菌剂、抗高血压药、抗炎剂、抗肿瘤剂、抗焦虑剂、酶活化剂、核酸结构,免疫刺激剂,免疫抑制剂,生理活性气体或疫苗。

5. 根据权利要求4的组合物,其中所述的药物活性试剂是核酸结构。

6. 根据权利要求3的组合物,其中所述的诊断试剂选自超声对比剂,放射对比剂,或磁对比剂。

7. 根据权利要求6的组合物,其中所述的磁对比剂是一种含氟的磁共振成像剂。

8. 根据权利要求7的组合物,其中所述的含氟的磁共振成像剂选自:

(a)  $C_xF_{2x+Y-Z}A_Z$ , 其中

$X=1-30$ ,

$Y=2$ ; 或当  $X \geq 2$  时是 0 或 -2; 或当  $X \geq 4$  时是 -4,

$Z=0$  至  $(2X+Y-1)$  的任何整数, 和

A 是选自氢, 除氟外的卤素, -CN, -OR, 其中 R 是氢, 烷基, 氟烷基, 链烯基, 氟链烯基, 炔基, 氟炔基, 芳基, 氟芳基, 链烷醇基(alkanoyl), 氟链烷醇基(fluoroalkanoyl), 链烯醇基(alkenoyl), 氟链烯醇基(fluoroalkenoyl), 炔醇基(alkynoyl), 氟链炔醇基(fluoroalkynoyl),

(b)  $[C_xF_{2x+Y'-Z}A_Z]_aJR_{b-a}$ , 其中:

X, Z, A 和 R 如上所定义,

$Y'=+1$ ; 或当  $X \geq 2$  时是 -1 或 -3; 或当  $X \geq 4$  是

-5,

$J = O, S, N, P, Al$  或  $Si$ ,

$a = 1, 2, 3$ , 或 4 和

$b =$  对 2 价的  $J$  是 2, 或

对 3 价的  $J$  是 3, 或

对 4 价的  $J$  是 4,

(c)  $A' - [(CF_2)_x - O]_c - A''$ , 其中:

$x$  如上所定义,

$A'$  是选自氢, 卤素,  $-CN$ ,  $-OR$ , 其中  $R$  是  $H$ , 烷基, 氟烷基, 链烯基, 氟链烯基, 炔基, 氟炔基, 芳基, 氟芳基, 链烷醇基, 氟链烷醇基, 链烯醇基, 氟链烯醇基, 炔醇基, 氟链炔醇基,

$A''$  是选自  $H$  或  $R$ , 其中  $R$  同上所定义,

$C = 1 - 300$ , 或

(d)  $[(CF_2)_x - O]_{c'}$



其中:

$X$  是同上定义, 和

$c' = 2 - 20$ ,

以及它们任何两者或更多的混合物。

9. 根据权利要求 7 的组合物, 其中所述的诊断试剂能够由于局部氧浓度的改变而发生松驰率的改变。

10. 根据权利要求 7 的组合物,其中所述的诊断试剂能够在大约 22 至 55℃ 的温度范围内发生由固体向液体的相变。

11. 根据权利要求 3 的组合物,其中所述的营养剂是选自氨基酸,蛋白质,核酸,糖,碳水化合物,脂溶性维生素,脂类,或它们任何两者或更多的组合。

12. 根据权利要求 3 的组合物,其中所述的在所述外壳内的药物活性试剂溶解于或悬浮于一种生物相容分散剂中。

13. 根据权利要求 12 的组合物,其中所述的生物相容分散剂是选自豆油,椰子油,橄榄油,红花油,棉籽油,具有 4—30 个碳原子的脂肪族、环脂族或芳香族的烃,具有 2—30 个碳原子的脂族或芳族的醇,具有 2—30 个碳原子的脂族或芳族的酯,具有 2—30 个碳原子的烷基、芳基或环醚,具有 1—30 个碳原子并且还可以有一个以上卤素取代基的烷基或芳基卤化物,具有 3—30 个碳原子的酮,聚二醇,或它们任意两者或更多的组合。

14. 根据权利要求 3 的组合物,其中所述的药物活性试剂是完整地包裹在所述外壳之内。

15. 根据权利要求 1 组合物,其中所述的交联聚合物是一种天然存在的聚合物,一种合成聚合物,或它们的组合,

其中所述的聚合物,在交联之前,已共价连接上了巯基或二硫键。

16. 根据权利要求 15 的组合物,其中所述的天然存在的聚合物是选自含有巯基和/或二巯基的蛋白质,含有巯基和/

或二巯基的多肽,含有巯基如/或二巯基的脂,含有巯基和/或二巯基的多聚核酸,或含有巯基和/或二巯基的多糖。

17. 根据权利要求 16 的组合物,其中所述的蛋白质是选自血红蛋白、肌红蛋白、白蛋白,胰岛素,溶菌酶,免疫球蛋白,α-2-巨球蛋白,纤维坏死蛋白(fibronectin),玻璃体坏死蛋白(Vitronectin),纤维蛋白原,或它们任意两者或更多的组合。

18. 根据权利要求 17 的组合物,其中所述的蛋白质是白蛋白。

19. 根据权利要求 17 的组合物,其中所述的蛋白质是血红蛋白。

20. 根据权利要求 17 的组合物,其中所述的蛋白是白蛋白与血红蛋白的组合物。

21. 根据权利要求 16 的组合物,其中所述的多糖是选自藻酸酯(盐)、高 M—含量的藻酸酯(盐)、多聚甘露糖醛酸、多聚甘露糖醛酸盐,透明质酸,透明质酸盐,肝素,葡聚糖,脱乙酰壳多糖,几丁质,纤维素,淀粉,糖原,瓜耳胶,刺槐豆胶,葡聚糖,果聚糖,旋复花粉,环葡聚糖,琼脂糖,黄原胶,carageenan,肝素,果胶,gellan 胶,硬葡聚糖,或它们任意两者或更多组合。

22. 根据权利要求 15 的组合物,其中所述的合成聚合物是选自合成的含有半胱氨酸残基和/或二巯基的多(聚)氨基酸,含有巯基和/或二巯基的合成多肽,含有游离巯基和/或二巯基的改性的聚乙烯醇,经改性含有游离巯基和/或二硫

基的聚羧乙基异丁烯酸酯,经改性含有游离巯基和/或二巯基的聚丙烯酸,经改性含有游离巯基和/或二巯基的聚乙基恶唑啉,经改性含有游离巯基和/或二巯基的聚乙烯吡咯烷酮,经改性含有游离巯基和/或二巯基的聚丙烯酰胺,经改性含有游离巯基和/或二巯基的聚二醇,以及它们任意两者或多者的混合物。

23. 根据权利要求1的组合物,其中所述的气体是选自空气、氧气、氩气、氮气、一氧化碳、二氧化碳、氮、氩、一氧化二氮、一氧化一氮、或它们任意二者或多个的组合。

24. 根据权利要求1的组合物,其中交联聚合物上的二硫键是由超声辐射形成的。

25. 根据权利要求1的组合物,其中所述的含有生物制品的聚合物外壳是悬浮在一种生物相容介质中,并且其中所述的生物相容介质是选自水,缓冲水溶液介质,盐水,缓冲的盐水,氨基酸溶液,蛋白质溶液,糖溶液,维生素溶液,碳水化合物溶液,合成的聚合物溶液,含有脂类的乳化液,或它们任意两者或多个的组合。

26. 根据权利要求1的组合物,其中所述的聚合物外壳是被一种合适的试剂改性的,其中所述的合适的试剂是选自合成的聚合物,磷脂,蛋白质,多糖,表面活性剂,化学改性剂,或它们的组合,其中所述的试剂与所述的聚合物外壳通过任意的共价键相结合。

27. 一种制备用于体内传送的生物制品的方法,所述方法包括将含有能够被二硫键交联的生物相容材料的水介质



与生物制品经过高强度超声条件处理一段时间,足以促使所述生物适其中所述试剂基本上被完全包裹在聚合物外壳中,并且

其中所述外壳的最大截面直径不超过 10 微米。

28. 一种向患者体内传送生物制品的方法,所述方法包括给患者使用有效量的权利要求 1 的组合物。

29. 一种给患者输送血液代用品的方法,所述方法包括给所述患者使用有效量的权利要求 2 的组合物。

30. 一种给患者传送生物制品的方法,所述方法包括给所述患者使用有效量的权利要求 25 的组合物。

31. 一种获得体内磁共振影像的方法,它是通过给患者使用权利要求 8 所述组合物而获得的。

32. 一种用于体内传送紫杉醇的组合物,其中紫杉醇是悬浮于一种生物相容液体中,并且其中所得到的混悬液含有截面直径不超过约 10 微米的紫杉醇颗粒。

33. 一种制备用于体内传送的紫杉醇的方法,所述方法包括将紫杉醇和合适的介质经过超声辐射或研磨处理一段时间,以足以产生具有最大直径不超过约 10 微米的颗粒。

34. 一种含有与多阴离子结合的顺磁阳离子的组合物。

35. 一种向患者传送可用作 MRI 对比剂的顺磁阳离子的方法,所述方法包括给所述患者使用有效量的权利要求 34 的组合物。

## 说 明 书

---

### 用于体内传送生物制品的方法及用于该方法的组合物

本发明涉及生物制品的体内传送。一方面,是将生物制品与生物相容材料制成的聚合物外壳相结合。该生物制品可以聚合物外壳本身结合在一起,和/或将生物制品(或者是悬浮于/分散于生物相容分散剂中的生物制品)包含在聚合物外壳之内。另一方面,将与聚合物外壳相结合的生物制品给一个体给药,或者是分散于一种合适的生物相容液体中给药。

存在于血液中的微粒体和外来小体一般是由“血液过滤器官”,即脾脏,肺脏和肺脏,从血液循环中清除的。正常全血中所含有颗粒物质包括红细胞(一般直径8微米),白细胞(一般直径6—8微米)和血小板(一般直径1—3微米)。大多数器官和组织中的微循环可以使这些血液细胞自由通过。当血液循环中存在直径大于10—15微米的小血栓(血块)时,就会有毛细血管梗塞或阻塞的危险,导致局部缺血或氧缺乏以及可能出现组织坏死。因此,必须避免向血液循环中注射直径大于10—15微米的颗粒。尽管如此,小于7—8微米的颗粒混悬液还是相对安全的,曾经用它传送过脂质体和乳剂形式的药物活性成份,营养试剂,和成像用的对比剂。

颗粒的大小及其传送方式决定了它们的生物功能。

Strand 等人[in Microsphere — Biomedical Applications, ed. A. Rembaum, PP193—227, CRC Press (1988)]曾报道过颗粒的传送状况取决于它们的大小。在组织间质注射之后,大小在几毫微米至100毫微米之间的颗粒进入毛细淋巴管,在淋巴结中就会出现吞噬作用。静脉/动脉注射之后,小于大约2微米的颗粒会很快被血液中的网状内皮系统(RES),也称之为单核吞噬细胞系统(MPS),所清除。大于约7微米的颗粒在静脉注射之后,会被肺毛细管所捕获。动脉注射之后,在到达的第一个毛细血管床把颗粒捕获。小泡状的巨噬细胞捕获吸入的颗粒。

对于不溶于水或难溶于水对胃酸环境敏感的药物来说,不能按常规方式给药(如静脉注射或口服给药)。通过在表面活性剂或乳化稳定剂存在下将油稳定的药物与水溶液(如生理盐水)一起乳化制成稳定的微粒乳剂可以实现这些药物的非肠道给药。只要乳化剂的成份在药理学是惰性的,即可以将这些乳化剂静脉注射。例如,美国专利 NO. 4,073,943 描述了在表面活性剂如卵磷脂,普卢兰尼克(聚乙二醇与聚乙二醇的共聚物),油酸聚甘油酯等存在下将溶于油的非水溶性药理活性成份与水乳化后的给药。PCT 国际专利公开号 NO, WO85/00011 描述了具有适合于皮内或静脉注射大小范围的,用磷脂,如二肉豆蔻酰卵磷脂,包裹的麻醉药物微小滴剂。

有文献报道用蛋白微粒作用药理或诊断试剂的载体。通过热变性或化学交联已制备出了白蛋白微球体。热变性微球

体是在 100℃ 至 150℃ 的温度之间由一种乳化混合物(如,白蛋白,所要加入的试剂,和一种合适的油)制得。然后用一种合适的溶剂洗涤微球体,并贮存。Leucuta 等人(International Journal of Pharmaceutics vol 41:213—217(1988))描述热变性微球体的制备方法。

制备化学交联微球体的方法包括用戊二醛处理乳化液以使蛋白交联,然后洗涤和贮存。Lee 等人[Science Vol. 213:233—235(1981)]和美国专利 No. 4,671,954 报导了这种制备方法。

上述用于制备作为药理活性成份载体的蛋白微球体的方法,虽然适用传送水溶性试剂,但不能携带不溶于水的试剂。这种限制是基于使油包水乳剂的水相中蛋白成份交联或热变性的制剂技术所固有的。任何水溶性试剂溶于含有蛋白的水相中可以被这种所产生的交联或热变性蛋白基质所包裹携带,但是难溶于水或溶于油的试剂不能结合到由这些方法形成的蛋白基质中。

因此,许多难溶于水的生物制品给人体给药带来了问题。的确,如果口服给药传送药物是无效的,这种本来不溶于或难溶于水介质的药理活性成份的传送会受到严重削弱。因此,目前用于传送本来不溶于或难溶于水介质的药理活性成份的制剂中需要加入试剂以稳定药理活性成份。尽管如此,用于稳定药理活性成分的试剂(如乳化剂)还是会经常引起严重的过敏反应。因此,一般的给药方法是在注射药理活性成份之前先用抗组织胺药和类固醇治疗病人以减少药物传

送所加入试剂的过敏作用。

在努力改进本来不溶于或难溶于水介质的药物水溶性过程中,一些研究者曾用能带来强水溶性的官能团对药物的结构进行化学改性。现有技术中所述的化学改性是制备磺化的衍生物[Kingston et al., 美国专利 5,059,699(1991)],和氨基酸酯[Mathew et al., J. Med. Chem. Vol. 35:145-151(1992)],它表现出明显的生物活性。这种改性产生的水溶性衍生物有助于本来不溶于或难溶于水的药物在水介质(溶于无害的载体如生理盐水)中的静脉内传送。尽管如此,但这种改性给药物制备增加了成本,还会引起不希望发生的副作用和/或过敏反应,和/或降低药物的效果。

常常难以传送的生物制品是氧。的确,不能过分强调用作红细胞代用品(“血液代用品”或“人造血”)的临床安全性和有效的氧携带介质的要求。这些介质的一些可能的用途包括(A)一般的输液应用,包括常规和紧急情况下替代急性失血,(B)在器官移植前体外支持器官或体内手术中支持器官,(C)向体内局部缺血的组织 and 器官加强氧传送,(D)向血管供应不足的肿瘤加强氧传送以增加放疗或化疗的效果,(E)在实验研究中支持器官或动物,和(F)向培养基中的活细胞增加氧输送。

输血可以用来补充患有各种疾病的病人的血液动力系统,这些疾病包括血容量的减少,(如由于失血引起),红细胞数目的减少(如,由于骨髓破坏引起的)或血细胞受损或破坏(如由于溶血性贫血引起)。输血不仅可以增加血管内的容

量,而且还可以提供携带有溶解氧的红细胞有助于向组织供氧。

在向已经过大量失血的病人的输血过程中,对于供血者和接受输血者的血型要小心匹配以使之相容。这样常使病人经历一段有害的缺氧时间。而且,即使是有通过预先采血和贮存的病人自己提供的自体红细胞,由于存放时间的原因这些自体细胞氧携带能力和安全性都会降低。因此,在输液后24小时的时间内,病人会处于非最佳氧传送状态。最后,在所有的全血或从中得到的红细胞输血过程中,一直存在着病人受病毒和/或细菌感染的危险。

因此,大家公认需要有一种在正常环境状况下用于氧运输和传送的替代物质,它应具有如下特性。理想的是,用于氧运输和传送的物质应当能够携带和传送氧到达装置、器官和组织以致于使这些环境保持正常的氧压。理想的这种物质应当是安全和无毒,无细菌和/或病毒污染,和无抗原性和无热原性(也即小于0.25EU/ml)。另外,用于氧运输和传送的物质应当具有与血液相匹配的粘度、胶态和渗透特性。还希望这种物质能够长时间地保持在病人的血液系统内,从而使得病人自己的红细胞再生和成熟。而且,还希望使用的这种物质不影响或阻碍红细胞的生成。

目前,已有一些静脉液体可用于治疗急性血容量减少,包括类晶体的,如乳酸盐林格溶液或生理盐水,和胶体溶液,如正常人血清白蛋白。类晶体和胶体的溶液可以暂时地纠正血容量的不足,但是不能直接补充给组织的氧传送。尽管输

血是优选的治疗方式,但是是否能够有足够量的安全 的血液来源是一个永久性的问题。

其他一些经常是不溶于或难溶于水介质,并且希望是溶于一种无毒载体如生理盐水中给药的,且有利于尽可能减少不希望发生的副作用和/或过敏反应 的生物制品是一些诊断试剂,如对比试剂。

对比剂在放射学成像过程中是需要的,因为它能够有利于观察器官(也即,它们的位置,大小和形态)和其它的细胞结构与周围组织的区分。例如,即使软组织具有显著不同的生物学功能(如,肝和脾),但它们具有类似的细胞组成(即,它们基本由水组成)。

磁共振成像(MRI)或核磁共振成像技术是应用射频辐射检查应用磁场强度下的特定原子核。在某些方面它类似于X—线计算机体层成像(CT),它能提供(在某些情况下)器官的断层成像,并且有可能具有明显的软组织分辨率。目前应用当中,它的影像是器官和组织中质子的分散图。但是,与X—线计算机体层成像不同的是,MRI 不使用离子化辐射。因此,MRI 是一种安全无害的医学成像技术。

尽管 NMR 现象早在 1954 年就被发现了,但是将其作为描述内部结构的工具用于医学诊断只是近些年的事情。该技术是由 Lauterbur [Nature 242: 190—191 (1973)] 首次建立的。

大家熟知具有合适的核旋转的原子核在应用磁场的方向上排列成直线。核旋转可以是两种方式排列成直线:与外

部磁场方向相同或相反。沿磁场方向排列更为稳定;而在不稳定状态中排列(即,逆磁声方向)必须吸收能量。对于质子来说,在1特斯拉(1特斯拉= $10^4$ 高斯)磁场存在下这些核以42.6MHZ的频率旋进或共振,在此频率下,辐射的射率脉冲(RF)会激发原子核,并改变它们的旋转方向以逆磁场方向排列成直线。RF脉冲之后,被激发的原子核“松驰”或反回到平衡状态或沿磁场方向排列成行。可以用两种松驰术语描述松驰信号减弱。 $T_1$ ,旋转一点阵松驰时间或纵向松驰时间,是原子核返回到沿外部应用磁场方向的平衡状态所需要的时间。第二, $T_2$ ,或旋转——旋转松驰时间,是与单个质子旋转的起始连贯旋进时间间隔有关。不同种类的哺乳动物中各种体液、器官和组织的松驰时间都有完整的记录。

MRI的优点之一是可以选择不同的扫描平面和切面厚度而不会失去分辨率。这使得能够直接获得高质量的横向、冠状和矢状的影像。MRI设备中没有任何移动部件保证了高度的可靠性。一般认为在选择性地检查组织方面MRI比X—线计算机体层成像(CT)具有更大的潜能。在CT中,X—线衰减系数单独确定影像对比,而至少有三种分离的变量( $T_1$ , $T_2$ 和原子核旋转密度)决定了磁共振影像。

由于器官和组织中的细微生理—化学差异,MRI能够区别组织的类型并检查出X—线或CT所不可能检查出的疾病。比较而言,CT和X—线只能对组织和器官中电子密度的差异敏感。由MRI技术能够得到的影像,由于具有更好



的立体分辨率,还能使医生检查出比CT能够检查出的更小的结构。另外,使用MRI技术可以容易地获得任何影像扫描平面,包括横向,冠状和矢状的。

目前,MRI被广泛用于许多医学疾病的辅助诊断。例如,关节损伤,骨髓疾病,软组织肿瘤,纵隔浸润,淋巴结病,海绵状血管瘤,血友病,肝硬化,肾细胞癌,子宫平滑肌瘤,子宫内膜异位,乳腺癌,狭窄性病变,冠状动脉疾病,分割性动脉瘤,脂肪瘤肥大,房间隔病,狭窄性心包炎,等等。[见,例如,Edelman & Warach, Medical Progress 328:708—716 (1993);Edelman & Warach, New England J. of Medicine 328:785—791(1993)]。

常规使用的磁共振成像目前是基于来自细胞内水分子的质子信号。因此,经常难以解释影像和区分单独器官及细胞结构。有两种可能的方法来更好地区分质子信号。第一种是使用对比剂来改变一个区域内水分子的 $T_1$ 或 $T_2$ 以与其他区域比较。例如,亚乙基三胺五乙酸钆(Gd-DTPA)可以缩短它附近水分子的质子 $T_1$ 松弛时间,从增强了所获得的影像。

如上所述,顺磁阳离子,例如,Gd,Mn,和Fe是良好的MRI对比剂。它们能够缩短周围水的质子 $T_1$ 松弛时间,以增强所获得的MRI影像,否则这种影像是无法阅读的。

第二种区分单独器官和细胞结构的方法是导入另一种能够成像的原子核(即,成像剂)。使用第二种方法,只能在对比剂到达的地方成像。这种方法的优点是排除周围水的干扰

而获得影像。合适的对比剂必须是生物相容的(即,无毒,化学稳定性,不与组织发生反应)并能在有限的时间内从体内消除。

虽然氢一直被选为 MRI 扫描的典型基础(因为体内有大量的氢),但是由于缺乏对比,产生的是非常差的影像区域。因此,使用其他的活性 MRI 原子核(如氟)具有优越性。Mattery 曾在文章中[见 SPIE, 626, XIV/PACS IV, 18—23 (1986)]描述了在不同诊断成像技术如超声波,磁共振,放射照相和计算机体层照相中使用特定的全氟化碳。使用氟是有益的,因为在体内天然不存在氟。

现有技术提到的可用于医学诊断目的的磁共振的含氟化合物限于从一组水溶性或能够形成乳剂的含氟分子中选择。因此,现有技术中使用水溶性氟化碳的氟化碳乳剂具有许多缺点,例如,1)使用了不稳定的乳剂,2)缺乏器官特异性和目标性,3)由于使用了乳化剂和表面活性剂(如卵磷脂和卵黄卵磷脂)有可能诱发过敏反应,4)传送能力有限,和 5)静泳注射后这种水溶性氟化碳很快被血液稀释。

根据本发明,提供了用于体内传送生物制品的,适合于以水悬浮液非肠道给药的微颗粒形式的组合物。本发明组合物含有与聚合物外壳相结合的生物制品(固体、液体或气体的)。该聚合物外壳是一种有二硫键存在下交联的生物相容材料。与生物制品相结合的聚合物外壳可以悬浮于一种生物相容基质中给药。用本发明组合物传送生物制品排除了以含有,例如,乙醇和多乙氧基蓖麻油,并用生理盐水稀释的乳剂

形式给药生物制品的必要性(见,例如,Norton et al., in Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus, September 23—24, 1992)。这些已知组合物的缺点是它们有可能产生过敏副作用。

根据本发明的另一方面,惊奇和未预料地发现根据本发明制备的不溶结构的血红蛋白(Hb)可以可逆性地结合氧。本发明的不溶性血红蛋白结构(IHC)结合氧的氧亲合性与用红细胞中可溶性血红蛋白分子或现有技术中曾描述过的用作可能的血液代用品的可溶性改性的血红蛋白分子获得的氧亲合性相似。

根据本发明的另一方面,还提供了将生物制品包裹在聚合物外壳中的方法。本发明的另一方面,还提供了获得局部氧和温度数据的方以及获得体内器官和组织的氟磁共振影像的方法。

以微颗粒混悬液的形式传送生物制品,通过使不同大小的颗粒和通过不同途径给药,可以在某种程度上到达靶器官如肝脏,肺脏,脾脏,淋巴循环系统,等。本发明的传送方法还使得生物制品给药,例如基本上水不溶性药理活性成份的给药,以比现有技术的传送系统所需的给药体积和时间(即:传送一典型人体剂量的 200—400mg 的紫杉醇需要在 24 小时的时间内静脉输液大约 1 至 2 升的液体)更小的液体量和大大减少的给药时间来完成。

例如,本发明聚合物外壳的混合液可以静脉内给药,使得产生血管化器官(如肝脏,脾脏,淋巴和肺)和骨髓的影像

成为可能。由于网状内皮系统(RES)(也称之为单核吞噬细胞(MNP)系统)能够摄取微米大小的含有机氟的聚合物外壳,因此可以获得器官靶特异性。象肝脏和脾脏这样的器官在从血液中清除外来品种物质(如,颗粒物质)过程中起着重要作用,因此经常被称之为“血液过滤器官”。

这些器官组成了大部分的网状内皮系统。此外,淋巴循环中的淋巴结合有网状内皮系统的细胞。所以,使用本发明的微米大小的含有机氟聚合物外壳使淋巴系统的成像成为可能。口服给药或作成一种栓剂,也能进行胃和胃肠道的成像。这种悬浮液也能被注入非血管部位,如脑脊髓腔使这些部位成像。

作为本发明的又一实施例,顺磁阳离子如 Gd, Mn, Fe 等能与多聚阴离子如藻酸盐连结,并用作一种有效的 MRI 对比试剂。

本发明通过下述方法克服了现有技术中的缺陷,即提供了 1)含生物制品的聚合物外壳的可注射用悬浮液,2)与简单的乳化液相比具有增强了的稳定性形式的生物制品,3)由于 RES 或 MNP 系统摄取本发明的聚合物外壳,而具有靶器官的特异性(例如,肝,脾,肺等),4)无乳化剂体系,由此避免了可能潜在引发过敏反应的试剂,以及 5)由于本发明含有生物制品的聚合物外壳能够把一个特定器官作为靶目标,从而具有注射相对少剂量的生物制品并仍能获得较好反应的性能。

图 1 是按照本发明所制备的一种聚合物外壳的示意图。

图中, A 指不溶性二硫化物交联的聚合物外壳, B 指该聚合物外壳的内部, 它含有氧或其它气体, 含有溶有氧的氟代烃, 溶有生物制品的一种生物相容油, 含水基质中溶有生物制品的油包水型乳化液, 液体中扩散有固体颗粒的一种混悬液等等, C 表示该聚合物外壳的厚度, 一般大约为 5—50 毫微米, 而 D 是表示该聚合物外壳的直径, 一般大约在 0.1 至 20 微米的范围内。

图 2 表示无基质的血红蛋白溶液的氧结合曲线(虚线曲线)和含有本发明不溶性血红蛋白结构的溶液的氧结合曲线(实线曲线)(即, 以希耳氏系数与氧分压的函数表示的曲线)。本发明不溶性血红蛋白结构的实际数值点用实心框表示。

图 3 表示无基质的血红蛋白溶液的氧结合曲线(虚线曲线)和含有用 1.7mM 变构效应物 2,3—双磷酸甘油酯(2,3—BPG)处理后的本发明不溶性血红蛋白结构的溶液的氧结合曲线(实线曲线)。本发明不溶性血红蛋白结构的实际数值点用实心框表示。

按照本发明, 提供一种体内传送生物制品的组合物, 其中所述的生物制品选自于:

基本上完全包含在一种聚合物外壳中的一种固体, 它可以是分散在一种生物可适应的扩散剂中,

基本上完全包含在一种聚合物外壳中的一种液体, 它可以是分散在一种生物可适应的扩散剂中,

基本上完全包含在一种聚合物外壳中的一种气体, 它可

以是分散在一种生物可适应的扩散剂中，

与聚合物外壳相结合的一种气体，或者是上述任意两种或多种的混合物，

其中该壳最大横切面直径不大于10微米左右，其中该聚合物外壳含有一种基本上以二硫键交联的生物可接受的物质，以及

其中该聚合物外壳的外部可以用一种适当试剂任意改性，其中该试剂是通过共价键与该聚合物外壳连接的。

这里所用的术语“体内传送”是指通过口服、静脉、皮下、腹膜内、鞘内、肌肉内、颅内、吸入、局部、经皮、栓剂(直肠)、阴道栓(阻道)等等给药途径来输送一种生物制品。

这里所用的术语“生物制品”是指药物活性剂(如止痛剂，麻醉剂，止喘药，抗菌素，抗抑制药，抗糖尿病药，抗真菌剂，抗高血压药，抗炎剂，抗肿瘤剂，抗焦虑剂(anxiolytic agents)，酶活化剂，核酸结构，免疫促进剂，免疫抑制剂，生理活性气体，疫苗等)，诊断试剂(如超声对比剂，放射对比剂，或磁对比剂)，有营养价值的试剂等等。

这里所用的术语“微米”是指毫米的千分之一的测量单位。

许多生物相容物质可以被用于实施本发明形成一种聚合物外壳。这里所用的术语“生物相容”是指不会以任何有害方式明显改变或影响它所被导入的生物系统的物质。基本上任何天然或合成的结构中含有巯基或二硫键的物质可用来制备二硫键交联的外壳。巯基或二硫键可预先存在于生物相

容物质结构中,或者通过一种适宜的化学改性将它们导入。例如,对这种改性来说天然产生的生物相容物质如蛋白质,多肽,寡肽,多核苷酸,多糖(如,淀粉,纤维素,葡聚糖,藻酸盐,脱乙酰壳多糖,果胶,透明质酸等等),脂类,等等都是都选择的物质。其它连接键如酯键,酰胺键,醚键等也能在超声照射步骤中形成(只要在起始物中含有必要官能团)。

作为生物相容物质的适当例子,天然产生的或合成的蛋白只要具有足够的巯基或二硫键以形成交联(例如,在超声照射中由于氧化作用通过二硫键形成),这些蛋白质都可以使用。蛋白质的适当例子包括白蛋白(含有35个半胱氨酸残基),胰岛素(含有6个半胱氨酸),血红蛋白(每个 $\alpha_2\beta_2$ 单位含有6个半胱氨酸残基),溶菌酶(含有8个半胱氨酸残基),免疫球蛋白, $\alpha-2$ -巨球蛋白,纤维素坏死蛋白(fibronectin),玻璃体坏死蛋白(vitronectin),纤维蛋白原等等,以及它们中的任意两种或多种的混合物。

目前用于形成聚合物外壳的优选蛋白质是白蛋白。用于形成聚合物外壳的其它优选蛋白质是血红蛋白。还有用于形成聚合物外壳的其它优选蛋白质是白蛋白和血红蛋白的混合物。或者,象 $\alpha-2$ -巨球蛋白(一种已知的调理素)这样的蛋白质可以用来促进巨噬细胞样细胞对包裹有生物制品颗粒的外壳的摄取,或者促进肝脏、脾脏对外壳包裹颗粒的摄取。在形成聚合物外壳过程中,也可以使用其他的功能性蛋白质,如,抗体或酶,它们能够促进传送生物制品到达所希望的靶位点。

类似地,含有巯基或二硫键的合成多肽对形成具有一种聚合物外壳的颗粒来说也是良好的可选择物质。此外,聚二醇(如,直链或支链的),聚乙烯醇,甲基丙烯酸多羟基乙酯,聚丙烯酸,聚乙基噁唑啉,聚丙烯酰胺,聚乙烯吡咯烷酮等等对化学改性(导入巯基和/或二硫键以及壳体形成(通过引起它们的交联)来说都是良好的可选择物。

在制备本发明组合物中,人们能够任意使用一种分散剂来悬浮或溶解生物制品。能够用于实施本发明的分散剂包括能悬浮或溶解生物制品但不与形成壳体所用的聚合物或者生物制品本身产生化学反应的任何液体。例如水,植物油(如,大豆油,矿物油,玉米油,菜子油,椰子油,橄榄油,红花油,棉花籽油等),具有4—30个碳原子的脂族、环脂族、或芳香烃(如正—十二烷,正—癸烷,正—己烷,环己烷,甲苯,苯,等),具有1—30个碳原子的脂肪醇或芳香醇(如,辛醇等),具有2—30个碳原子的脂肪酸酯或芳香酯(如辛酸乙酯等),具有2—30个碳原子的烷基,芳基、环醚(如,二乙醚,四氢呋喃等),具有1—30个碳原子的烷基卤化物或芳基卤化物(和可以是一个以上的卤素取代基,如, $\text{CH}_3\text{Cl}$ , $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , $\text{CH}_2-\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ 等),具有3—30个碳原子的酮类(如丙酮,丁酮等),聚二醇(如,聚乙二醇等),或者它们中任意两种或多种的混合物。

特别优选的分散剂组合物包括挥发性液体如二氯甲烷,乙酸乙酯,苯等(即,对药物活性剂有高级溶解性并能溶于所用的其它分散剂的溶剂)和一种挥发性较低分散剂。当加



入到其它分散剂时,这些挥发性添加剂有助于促进药物活性成份在该分散剂中的溶解。由于该步骤常耗费时间所以这种混合物是最理想的。溶解完成后,可以蒸发除去这些挥发性组分(任选在真空下)。

按本发明所述制备的,基本上完全包含在聚合物外壳中或与之结合的生物制品颗粒,可以是只以颗粒形式给药,或者是以一种溶于生物相容基质中的混悬液给药。这种基质可以选自于水,缓冲的含水基质,生理盐水,缓冲的生理盐水,任选缓冲的氨基酸溶液,任选缓冲的蛋白溶液,任选缓冲的糖溶液,任选缓冲的碳水化合物溶液,任选缓冲的维生素溶液,任选缓冲的合成聚合物溶液,含脂类的乳化液等等。

按照本发明的其它实施方案,还提供了用于体内传送的生物制品制剂的制备方法,该方法包括把含有能够被二硫键交联的生物相容物质的基质和生物制品经过高强度超声条件处理一段时间,足以促使该生物相容物质被二硫键所交联;其中所述的生物制品基本上完全包含在聚合物外壳中,并且其中该壳的最大横切直径不大于10微米。

因此,按照本发明,包含在聚合物外壳中的生物制品是用高强度超声合成的。在形成稳定的聚合物外壳中包括两个非线性声学处理步骤(即,声波乳化和空化)首先,声波乳化使该生物制品分散在蛋白水溶液中。然后通过形成二硫键来化学交联和稳定所形成的分散体。用经过声波空化产生的过氧化物氧化半胱氨酸的残基(这里的聚合物是一种蛋白质如白蛋白)来形成二硫键。

可选用离心过滤器(100KDa 截获)过滤所得到的悬浮液并把滤得的结构或微囊悬浮于生理盐水或适当的缓冲液中。图1显示了这样一种结构的示意图。这些结构的平均直径为2微米左右。用一台Elzone 颗粒计数器所测定的颗粒大小分范围是相当窄的(一般观察到平均直径在3微米左右的高斯分布)。用这种技术得到的颗粒大小范围是在0.1至20微米之间。优选颗粒大小范围在0.5到10微米之间,最优选范围是1到5微米。这种颗粒大小特别适合于医学应用,这是因为能够进行静脉内或动脉内注射,而没有小血管堵塞和继发组织(因氧气缺乏而局部缺血)坏死的危险。作为对照,正常红细胞直径大约是8微米。

上述步骤的非显而易见特征是分散剂的选择,物别涉及到分散剂的极性选择。有关生物制品颗粒的壳体的形成过程包括,在水相和非水相之间的交界处,使生物相容物质重新取向,从而使生物相容物质中的亲水区暴露于水相,而生物相容物质中的疏水区定向于非水相。在该生物相容物质是一种蛋白质的情况下,为了完成其构象的有效展开或改变,必须给这种聚合物提供能量。在两种液相(即水相和非水相)间的界面自由能(界面张力)使界面处的蛋白构象发生改变。热能也是蛋白构象展开和/或改变所需的能量库。

热能输入是下列变量的函数,即:高强度超声波辐射过程中所用的声音功率,高强度超声波辐射的时间,经受高超率超声波辐射的物质性能,经受高强度超声波辐射的物质性质等。高强度超声波辐射过程中的声音功率变化范围很大,

一般在1到1000特/厘米<sup>2</sup>的范围内;50到200瓦特/厘米<sup>2</sup>是声音功率的优选范围。类似地,暴露于高强度超声波辐射的时间变化范围也很大,一般在几秒钟到大约5分钟的范围内。在高强度超声波辐射中的暴露时间最好在大约15到60秒钟范围内。本领域熟练技术人员公知所用的声音功率越高,需要在高强度超声波辐射的暴露时间就越短,反之亦然。

界面自由能与两种液体间极性差值成正比。所以在指定操作温度下两种液体间界面处的最小自由能是形成所需聚合物外壳的基本能量。因此,如果使用同源系列的分散剂而逐渐改变其极性,如,烷基酸乙酯,那么同源性越大就越没有极性,即,这些分散剂和水间的界面张力是随着酯类中碳原子数目的增大而增加的。所以,我们发现,尽管乙酸乙酯是与水不溶混的(即,一种两个碳原子酸的酯),但是在室温下(~20°C),这种分散剂单独不会产生较大产率的聚合物外壳包裹的颗粒。相反,一种高级酯如辛酸乙酯(一种8个碳原子酸的酯)却产生较高产率的聚合物外壳包裹的颗粒。实际上,庚酸乙酯(一种7个碳原子酸的酯)产生中等产率的颗粒而较低级的酯(3,4,5或6个碳原子酸的酯类)得到更低的产率。因而,在指定温度下,人们能够设定一个形成高产率聚合物外壳包裹的颗粒所需的最小含水分散剂界面张力的条件。

温度是可以被控制影响聚合物外壳包裹颗粒产率的另一个变量。通常,液体表面张力随着温度的增长而降低。温度对表面张力的变化率经常因不同液体而不同。所以,例如,两种液体之间的界面张力( $\Delta\gamma$ )可以是 $T_1$ 温度下的 $\Delta\gamma_1$ 和

$T_2$  温度的  $\Delta\gamma_2$ 。如果  $T_1$  下的  $\Delta\gamma_1$  与形成本发明聚合物外壳所需的最小值接近,并且,如果  $\Delta\gamma_2(T_2 \text{ 温度下})$  大于  $\Delta\gamma_1$ ,那么,从  $T_1$  到  $T_2$  的温度改变将增加聚合物外壳的产率。实际上,这种变化在使用庚酸乙酯的情况下可以观察到,在  $20^\circ\text{C}$  庚酸乙酯得到中等产率而在  $10^\circ\text{C}$  得到较高产率。

温度也影响所用液体的蒸气压。温度越低,总蒸气压就越低。总蒸气压越低,空泡的破裂就越有效。超声波辐射空泡的崩破率增加与过氧化物( $\text{HO}_2^-$ )形成率的增加相关。过氧化物生成率增加可以使较低温上聚合物外壳的产率增加。但是,尽管如此,与此相反,用过氧化物离子氧化巯基(即,形成二硫键)的反应率是随着温度的增长而增加的。所以,对一种经过超声波辐射条件处理的指定液体来说,存在一个能够获得高产率聚合物外壳的相当窄的最佳温度操作范围。

因而两种作用的结合,即,表面张力随温度的变化(它直接影响到该聚合物的展开和/或构象的改变)和反应产率随温度的变化(该反应是指通过形成二硫键而发生的聚合物交联)这两者的结合表示了聚合物外壳包裹颗粒的总体变化和产率。适合于制备本发明聚合物外壳的温度在大约  $0-80^\circ\text{C}$  的范围内。

可对上述超声波辐射步骤进行操作来生产含有具有一定大小范围的生物制品的聚合物外壳包裹的颗粒。这里优选颗粒半径在大约  $0.1$  至  $5$  微米的范围内。在这个范围内较窄的大小分布非常适合于生物制品的静脉内给药。最好把聚合物外壳包裹的颗粒悬浮于生物相容的基质中(如本文所描述

的),再用适当方式给药。

此外,可以用一种适当的试剂对该聚合物外壳进行改性,其中该试剂是通过一种任意共价键与该聚合物外壳结合的。能够用于这种结合的共价键有酯键,醚键,氨基甲酸乙酯键,二酯键,酰胺键,仲胺或叔胺键,磷酸酯键,硫酸酯键以及其它类似的键。适合于这种任意改性聚合物外壳的适当试剂有合成聚合物(聚二醇(如直链或支链的聚乙二醇)),聚乙烯醇,甲基丙烯酸多羟基乙酯,聚丙烯酸,聚乙基恶唑啉,聚丙烯酰胺,聚乙烯吡咯烷酮等),磷脂(如磷脂酰胆碱(PC),磷酸酰乙醇胺(PE),磷脂酰肌醇(PI),神经鞘磷脂等),蛋白质(如酶,抗体等),多糖(如淀粉,纤维素,葡聚糖,藻酸盐,脱乙酰壳多糖,果胶,透明质酸等),化学改性剂(如5'-磷酸吡哆醛,吡哆醛的衍生物,二醛,琥珀酰水杨酸酯等),或者它们中任何两种或多种的混合物。

用一种聚合物外壳包裹的溶解生物制品的一般情况是可能发生变化的。可以使用生物制品颗粒在生物相容分散剂中的混悬液(替代含有溶解的生物制品的生物相容分散剂)来生产一种含有分散剂悬浮的生物制品颗粒的聚合物外壳。换句话说,这种聚合物壳体能含有一种生物制品在分散剂中的饱和溶液。另一种变化是含有一种生物制品固体核的聚合物壳体,它是先把生物制品溶于一种挥发性有机溶剂(如苯)中,形成聚合物外壳,再在真空下,如在旋转蒸发器中,蒸发挥发性溶剂或者将全部悬浮液冷冻干燥来制成的。这样就形成了一种用聚合物包衣包裹生物制品固体核的结

构。后一种方法对传送相对小体积大剂量的生物制品是特别有益的。在有些情况下,形成该核外壳的生物相容物质本身可以是一种治疗剂或诊断剂,例如,对于胰岛素来说,它可以作为上述超声波辐射步骤中所形成的一种聚合物壳体的一部分来传送。在其它情况下,形成外壳的聚合物也能参与生物制品的传送,例如,当生物制品是胰岛素时,它可以作为上述超声波辐射步骤中所形成的聚合物壳体的一部分来传送,由此来提供一种具有高度氧结合力的血液代用品。

聚合物壳体的变化也是有可能的。例如,含有巯基的少量 PEG 能包括在该聚合物中。一旦暴露于超声波辐射,PEG 就与该聚合物交联并形成该聚合物外的一部分。另一方面,可以在制备该壳后将 PEG 连接在该聚合物外壳上(而不是作为制成该外壳的基质一部分)。

PEG 以其非粘合特性为人们所熟知,并且已经把它附着于蛋白质和酶上来增加它们在体内的循环时间(Abuchowski 等, *J. Biol. Chem.* Vol. 252:578(1977))。PEG 还被附着于脂质体中形成脂质双层的磷脂上来降低它们在体内的摄取量,并延长它们在体内的停留时间(Klibanov 等, *FEBS Letters* Vol. 268:235(1990))。因此把 PEG 掺合进交联蛋白外壳的壁上能够改变它们的血液循环时间。这种性能被用来维持生物制品的较高血液浓度,并能延长该生物制品的释放时间。

适用于改性聚合物外壳的是亲电子 PEG 衍生物,它包括 PEG-咪唑,琥珀酸琥珀酰亚胺酯,碳酸硝基苯酯, tresy-

lates, 等; 亲核的 PEG 衍生物, 它包括 PEG-胺, 氨基酸酯, 酰肼, 硫醇等。PEG 改性的聚合物壳体比未改性的壳体能够在循环中持续更长的时间。用 PEG 改性聚合物的外壳可以在形成外壳之前或形成外壳之后进行。现在优选的技术是在形成聚合物外壳后对其进行改性。其它聚合物包括葡聚糖, 藻酸盐, 羟乙基淀粉等可以用于该聚合物外壳的改性。

本领域熟练技术人员可预想到在本发明范围和构思之内可以有一些改变。例如, 在形成聚合物外壳壁过程中, 可以改变该聚合物外壳中的分散剂, 可以使用许多不同的生物制品, 以及可以使用大范围的蛋白质和其它天然和合成的聚合物。它的应用范围也是相当广的。除了生物医学应用, 如传送药物、诊断剂(在成像中使用)、人造血液(声化学交联的血红蛋白)和胃肠外营养剂, 本发明的聚合物壳体结构还可以掺入化妆品中使用, 如在皮肤乳剂或护发产品、香水中使用, 在压敏墨水中使用, 在农药中使用。

按照本发明的一个实施方案, 如上所述制成的聚合物壳体可用于体内传送生物制品, 如药物活性剂, 诊断剂或有营养价值的试剂。可用于实施本发明的药物活性剂的例子有止痛剂(如, 醋酸米诺芬(acetaminophen), 阿斯匹林, 布洛芬, 吗啡及其衍生物等), 麻醉气体(如, 环丙烷, 安氟醚, 氟烷, 异氟烷, 甲氧氟烷, 氧化亚氮等), 平喘药(如, 萘甲酰嗪, 甲哌噻庚酮, traxanox 等), 抗菌素(如, 新霉素, 链霉素, 氨基糖苷, 头孢菌素, 氨基青霉素, 青霉素, 四环素等), 抗抑郁药(如, 甲苯噻唑辛, 氟苯哌啶啉, 丙咪嗪, 氟哌三唑酮(trazadone)等),

抗糖尿药(如,双胍,激素,磺尿类衍生物等),抗真菌剂(如,两性霉素B,制霉菌素,杀念珠菌素等),抗高血压药(如,心得安,苯丙酰苯心安,心得平,心痛定,利血平等),甾体抗炎药(如,可的松,氢化可的松,地塞米松,强的松龙,强的松,氟恶米松等),非甾体抗炎药(如,消炎痛,布洛芬,拉米芬酮(ramifenizone),吡氧噻嗪等),搞肿瘤药(如阿霉素,环磷酰胺,放线菌素,博来霉素,段诺霉素(duanorubicin),阿霉素,艾波霉素(epirubicin),自力霉素,甲氨蝶呤,氟尿嘧啶,碳铂(Carboplatin),卡氮芥(BCNU),顺氯氨铂,鬼白乙叉甙,干扰素,苯芥胆甾醇,紫杉醇(这里所用的术语“紫杉醇”是指包括紫杉醇类似物及其前体药物,紫杉烷以及其它类似于紫杉醇的药物,如 taxotere 等),喜树碱及其衍生物(该化合物对治疗结肠癌具有较可靠的疗效),长春花碱,长春新碱,以及激素类抗肿瘤药,如雌激素,孕激素类,三苯氧胺等),抗焦虑药(如,硝苯呋海因,安定等),酶活性剂(如,去氧核糖核酸酶,核蛋白体酶(ribozyme)等),核酸结构(如,IGF—1 编码序列,VIII 因子编码序列,IX 因子编码序列,反义核苷酸序列等),免疫促进剂(如,白芥素,干扰素,疫苗等),免疫抑制剂(如,环孢菌素(C,A),硫唑嘌呤,布雷青霉素(mizorobine,FK506,强的松等),生理活性气体(如,空气,氧气,氮气,氦气,一氧化氮,二氧化碳,氩气,氙气,一氧化二氮,一氧化氮,二氧化氮等,以及它们中任意两种两种或多种的混合物),还有其它药物活性剂,如甲氧咪胍,邻氯苯对氯苯二氯乙烷,维沙定(visadine),卤代亚硝基脲类



(halonitrosoureas), 蒽环类(anthracycline), 椭圆玫瑰树碱, 苯佐卡因, 巴比妥类等。

可用于实施本发明的诊断剂的例子有超声对比剂, 放射对比剂(如碘辛烷类, 卤化碳类, 肾造影剂等), 磁对比剂(如, 碳氟化合物, 脂溶性顺磁化合物, GdDTPA, 顺磁化合物水溶液等), 以及其它试剂(如, 气体, 象氩气, 氮气, 一氧化碳, 二氧化碳, 氦气, 氙气, 一氧化二氮, 一氧化一氮, 二氧化氮等以及它们中任意两种或多种的混合物)。

可用于实施本发明的有营养价值的试剂例子包括氨基酸、糖、蛋白质、碳水化合物、脂溶性维生素(如, 维生素 A, D, E, K, 等)或者脂肪, 或者它们中任意两种或多种的混合物。

本发明含生物制品的聚合物壳体与现有技术中的蛋白微球之间的主要区别在于构成的性质和形成该聚合物外壳后蛋白质的最终状态, 以及运送难溶于水或基本不溶于水的试剂的能力。按照本发明, 该聚合物(如蛋白质)是通过与许多蛋白质的天然结构中存在的氨基酸。例如半胱氨酸形成二硫键来进行选择性化学交联的。使用超声波辐射方法将含有溶解的或悬浮的生物制品的分散剂分散到一种具有巯基或二硫化物基团(如白蛋白)的生物相容物质的水溶液中, 由此在非水溶性基小滴的周围, 形成一种交联聚合物外壳。超声波辐射步骤在液体中产生空穴作用, 引起局部大量产热, 导致过氧化物离子的形成, 该离子通过氧化巯基残基(和/或断裂已存在的二硫键)交联聚合物而形成新的交联的二硫键。

本发明步骤相反,现有技术中戊二醛交联的方法是非特异性的,基本上与蛋白质结构中存在的任意的亲核基团(如,胺,巯基和羟基)反应。如现有技术中所述的加热变性作用可明显而不可逆地改变蛋白质的结构。相比而言,本发明所形成的二硫化物特异性非常强,并且基本上没有使蛋白质变性。此外,因为本发明方法制备的聚合物外壳比包裹颗粒的直径相对更薄,所以聚合物外壳中含有的生物制品颗粒或液滴不同于现有技术中交联或加热变性了的蛋白微球。(用透射电子显微镜检查法)已经测得聚合物包衣的“外壳厚度”大约为 25 微米,而被包裹的颗粒直径为 1 微米(1000 毫微米)。比较起来,现有技术的微球没有蛋白外壳,但是,却有分散于整个微球体积中的蛋白质。

含有固体、液体或气体的生物制品核的聚合物外壳可以用相对小的体积来传送大剂量的生物制品。这将减少在接受大量液体时患者的不适,并将减少住院时间。此外,聚合物外壳的壁一般可被蛋白水解酶在体内全部降解(如,当聚合物是一种蛋白质时),使得传送系统没有副作用,对现在的制剂来说这是常有的情况。

按照本发明这种实施方案,生物制品的液滴或颗粒被包含在截面直径不大于 10 微米左右的外壳中。截面直径小于 5 微米是较优选的,而对静脉内途径给药来说,2 微米左右截面直径是最优选的。

按照本发明的另一个实施方案,人们已经发现这里所述的聚合物外壳,当由血红蛋白制备时,具有令人惊奇的较高

的氧结合能力,因此可被用作血液代用品。血红蛋白(Lehninger, in Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York, PP. 145—149, 1975)是由四聚体(两个 $\alpha$ 和两个 $\beta$ 链)组成的64,500MW的蛋白质。每条 $\alpha$ 和 $\beta$ 链以一个非共价键连接一个血红素残基。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链也由氢结合和范德伏尔斯力形成的非共价键结合在一起。这四个血红素基团,每个亚单位中有一个能够结合四分子的氧。这些扁平的血红素基团在正方平面的配位处含有一个铁离子。在完整的分子中,这四个血红素位于相对远离于另外一个的位置。

在四聚物的血红蛋白分子中,血红素单位间在结合氧方面的相互作用或协同作用大大增加了每个血红素单位的氧结合能力。一般来说,一个单独的血红素单位应当能结合一个单一分子的氧。然而,在血红蛋白分子中相邻血红素单位的协同作用增加了每个血红素单位的氧结合。这种协同作用用术语“希尔系数”来描述,它的数值反应了相互作用的氧结合位点的数目。对天然血红蛋白来说,希尔系数大约为2.8。

在红细胞中可溶性血红蛋白占总蛋白的90%左右。由于血红蛋白的结合力,100ml的全血能够吸收大约21ml的氧气。与结合氧同样重要的是,血红蛋白也能有效地把结合的氧释放给组织。血红蛋白结合和释放氧的这种能力经常被定量表达为 $P_{50}$ (或 $P_{1/2}$ )。例如,整个血液的 $P_{50}$ ,即,导致血红蛋白50%饱和的氧分压,大约是28mmHg。

氧分压和血红蛋白饱和百分比之间的关系可用一个S形曲线来表示,曲线的位置受pH值的影响(波耳氏效应)。

在确定的氧分压下血红蛋白溶液的 pH 值越高,氧饱和的百分数就越大,而  $P_{50}$  越低;氧饱和曲线在横坐标上向左移动。相反,血红蛋白溶液的 pH 值越低,氧饱和的百分数也越小,而  $P_{50}$  就越高;氧饱和曲线在横坐标上向右移动。因此,当血红蛋白从相对碱性 pH 值的肺部移向相对酸性 pH 值的缺氧组织(由压氧呼吸产生乳酸)蛋白时,血红蛋白将有一个释放其运载的氧的趋向。所以,血红蛋白对氧的亲合力是与血红蛋白的  $P_{50}$  成反方向变化的。

血红蛋白分子或其构象的改变是与氧结合亲合力的变化有关的。例如,与 2,3-二磷酸甘油酯的结合(2,3-DPG,存在于红细胞中)放松了氧与血红蛋白的结合,从而促进了氧向组织的释放;例如在高海拔和怀孕期,这些需要增加氧气输送的生理条件下,血浆中的 2,3-DPG 含量上升。在血红素取代基中由  $Fe(II)$  到  $Fe(III)$  的铁离子的氧化导致了高铁血红蛋白(met-Hb)的形成,这种高铁血红蛋白和水结合得很紧以致于妨碍了氧的运送。这种氧化或者“自身氧化”是在体内进行的一个过程,红细胞中的氧化还原酶系统一直监视着这种氧化过程。

血红蛋白,这种运输和传递氧的蛋白质,能从红细胞壁的膜上或基质中(基质中含有决定血型的特殊抗原)和从其它细胞和血浆组分中分离。如果这种分离和离析是有效的话,所得到无介质的血红蛋白不含抗原物质;因此,不必要再进行按血型配血。

从红细胞微环境中提取出的无基质的血红蛋白(SFH)

已被发现具有特别紧密地结合氧的特性(低的  $P_{50}$ ), 并且输血后还具有一个较短的循环半衰期。较低的  $P_{50}$ , 是血红蛋白氧结合曲线左移的反应, 部分原因是无介质血红蛋白暴露于比红细胞内的 pH 值(7.2)更高的血浆 pH 值(7.4)的结果; 而且, 当血红蛋白从红细胞中除去时, 血红蛋白和 2,3-二磷酸甘油酯之间的自然关系被破坏; 从而更加降低了  $P_{50}$ 。就从循环中清除而论, 我们观察到无介质血红蛋白可由肾迅速清除, 输血半衰期( $t_{1/2}$ )仅 100 分钟左右, SFH 的希尔系数在 2.3—2.8 范围中。

我们已经测定出化学改性的血红蛋白克服了无介质血红蛋白的一些缺点。在现有技术中所描述的改良方法包括无介质血红蛋白的各种分子内交联方法; 无介质血红蛋白与低分子量试剂的分子内和分子间的交联的方法; 以及无介质血红蛋白与其它聚合物配合的方法。

无介质血红蛋白分子内交联的方法在现有技术中是已知的。例如, 见美国专利 4,584,130, 4,598,064 和 4,600,531。这种方法是通过一个反丁烯二酸根桥在蛋白质的  $\alpha$  链上共价连接赖氨酸 99 残基的方法来改性无介质血红蛋白。这种分子内交联的结果是, 双阿斯匹林交联的血红蛋白具有等同于血液的氧亲和力。而且, 双阿斯匹林交联的血红蛋白(分子量为 64,500)不能够再分解为二聚物(分子量为 32,250)。所以, 双阿斯匹林  $\alpha$ - $\alpha$  交联的血红蛋白的保留时间为 4 到 8 小时(这是无介质血红蛋白保留时间的两到四倍)。尽管如此, 当患者失去大量血液时, 由于需要一种能在几天内运送

氧气的氧载体,对治疗急性出血来说这种血红蛋白还是不能够提供足够长的维持时间。双阿斯匹林交联的血红蛋白的  $P_{50}$  在生物范围内(24—28mmHg)希尔系数也是这样(2.5—2.8)。

使用低分子量的交联剂也能使血红蛋白分子进行分子内相互交联。例如,在美国专利 4,336,248 中描述了优选加入磷酸吡哆醛之后,使用双醛使血红蛋白分子互相之间和/或血浆蛋白以及明胶衍生物进行配合。美国专利 NOS. 4,001,401,4,001,200,4,05,590 和 4,061,736 中描述了与双官能团或多官能团的低分子量交联剂进行的交联。分子间血红蛋白交联产物常常不是单一可溶性四聚物,而是多个血红蛋白四聚物通过共价键连接形成的可溶性低聚物。典型的是,这类分子间交联的产物通常具有不等同于血液的氧携带和输送性能(与全血的  $P_{50}$  值 28 相比戊二醛聚合的血红蛋白  $P_{50}$  为 18—23)并且它的希尔系数在 1.8—2.8 范围内。而且,现有技术中已知通过戊二醛进行分子间交联的产物是具有抗原性的[见 D H Marks 等, *Military Med.* 152: 473 (1987)]。

一般来说,血红蛋白分子内和分子间的交联降低一些由未改性的血红蛋白离解为  $\alpha\beta$ —二聚物所产生的肾的毒性问题。然而,由可溶性血红蛋白产生的胶体渗透压(COP)却并没有因分子内交联而显著降低。所以,这就限制了可溶性血红蛋白血液代用品适于给药的剂量。一般来说,COP 的增加会引起流体静压力的降低和肾小球过滤率的相应降低,引起

了少尿,严重情况下无尿。现有技术中所述的可溶性血红蛋白的给药已经引起了心动过缓,血压升高和肌酐清除下降。已发现血管收缩和血管梗阻是肾脏效应的病因,这些都是与使用可溶性血红蛋白血液代用品有关的。使用如本文所述制备的一种高度聚合形式的血红蛋白作为血液代用品以可缓解这些问题。

高度氟化的化合物,特别是全氟化碳化合物,由于其对氧的高溶解性,也已经被当作是红细胞代用品,适合于这种用途的高氟化化合物有全氟化碳类如,全氟萘烷,全氟二氢化萘,全氟甲基金刚烷,全氟三丙基胺,全氟三丁胺,全氟辛溴等。在静脉内使用时,与水不混溶的这些全氟化碳类必须分散成注射乳剂。在这些应用中常用的乳化剂是蛋黄卵磷脂和卵磷脂,二者都具有沉淀变态反应物的能力。例如参见, PCT 92/06517,它描述了含有氟化物和磷脂,如溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆胺,作为表面活性剂的一种乳剂,或者 PCT 93/11868 描述了用蛋黄卵磷脂作乳化剂的乳剂,它含有高氟化的,氟取代的,非环状有机化合物作为氧载体。

Fluosol-DA ( $\alpha$  治疗剂),是一种全氟萘烷和全氟三丙胺的乳浊液,它是 FDA 唯一批准用于预防球形冠状血管成形术中暂时局部缺血的药品。另一个氟化碳产品,含氧剂 (Alliance Pharmaceuticals) 或全氟辛溴也已被批准作为口服造剂。全氟化合物用作血液代用品的综述参见 Riess 等, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 17. 621-634(1978)。

现有技术中所述的血液代用品仅使用溶解性血红蛋白

作氧载体。的确,一般传统所接受的是,一种不溶性血红蛋白分子(例如,它是与其它血红蛋白分子过量聚合或交联到不溶的程度,或者它是由过度变性引起不溶的,等等)由于很有可能分子中氧结合位置而不适合用作可逆性结合氧。此外,现有技术的可溶性血红蛋白的希尔系数并不大于未改性的天然血红蛋白的希尔系数。

比较起来,本文所述的由血红蛋白制得的聚合物壳体是“巨大”的肉眼可见的分子(由于它大量聚合或交联了许多血红蛋白的四聚物分子),因为它有较大的体积,所以不溶于含水介质。在超声波辐射步骤中由于蛋白质半胱氨酸残基上的巯基的交联而发生聚合。按照本发明所制备的聚合物外壳,一般含有至少  $10^4$  个交联的聚合物分子,并且有  $10^{12}$  个血红蛋白四聚物交联成一个肉眼可见的血红蛋白“大聚合物”(megamer)。出人意料地发现氧能与这些具有亲和力的不溶性结构可逆性地结合,对一种红细胞(RBC)代用品来说它的亲和力在可用的范围中,即  $P_{50}$  在约 10mmHg 到约 50mmHg 之间。

有关本发明不溶性血红蛋白结构(IHC)的另一个令人惊奇并出人意料的发现是它有极高的希尔系数(n)。希尔系数是测定血红蛋白四聚物分子中氧结合位置(血红素单位)之间协同作用程度的一个指标。天然血红蛋白最大的希尔系数大约是 2.8,而现有技术中改性的血红蛋白一般报道的希尔系数少于 2.8。对本发明不溶性血红蛋白结构所测得的希尔系数特别大,一般在约 5 到约 25 范围内。不需要由任何作



用理论来限制,这些极高的数值是由邻近交联四聚物血红蛋白单位的氧结合位置之间相互作用或相互连接所产生的。基本上,人们相信希尔系数增大,表明在结合氧时不溶结构中多个四聚物在由脱氧-T(紧张的)状态转化为氧-R(松驰)状态过程中起着协同作用。

在本发明血红蛋白结构中所观察到的出人意料的大的希尔系数具有的优点在于每个血红蛋白四聚物单位所运载氧的量远远超出了天然血红蛋白或现有技术中修饰的血红蛋白所能达到的运载氧的量。这种增长了氧的运载能力大大有益于本发明用作RBC代用品。

在氧分压约为4—100mmHg范围内本发明血红蛋白结构具有最大的希尔系数。换句话说,在这个氧分压范围内能达到最大的协同作用。因为典型的肺泡 $pO_2$ 在这个范围之内,当用本发明结构作为血液代用品时,血红蛋白结构在肺中可以最大量的摄取氧。

另一方面,本发明结构向组织释放氧与生理血红蛋白非常相似,即,在典型的组织 $pO_2$ ( $<40$ mmHg)时,大部分结合在不溶性血红蛋白结构上的氧被释放给了组织充氧。所以,本发明的交联的不溶性血红蛋白在典型负载压下(如肺中)具有比现有技术中的血红蛋白更高的不寻常的氧结合能力(由于希尔系数较大),并且,在组织中所遇到的,典型压力下保持有效的氧释放能力。

由于本发明不溶性血红蛋白结构的交联性质和其体积,它可能比现有技术的红细胞(RBC)代用品更具有相当长的

体内循环时间。而且,由于它们的较大分子(肉眼可见的)体积,它们不可能诱发肾毒性问题,而这正是现有技术中所述的一般性四聚物或寡聚物可溶解形式的血红蛋白所存在的问题。

本发明的空的(“泡状”或微泡)不溶性血红蛋白结构可以在血红蛋白外壳或膜内装载一种适当的气体。所以,当血红蛋白“微泡”例如在一个外界设备或在肺中用氧平衡时,该结构或泡的中心核被未结合的或游离氧所饱和,这些氧通过分子扩散进入核中。所以这种结构除了与形成微囊外壳或膜的血红蛋白结合氧外,还在其空核的小空间内携带未结合的分子氧。这种系统运送未结合(但被包裹了的)氧的能力大大增加了核系统的氧运载容量,超过了单独由血红蛋白所运载的氧的量。现有技术中没有记载这种在氧与血红蛋白结合的同时还通过小空泡携带未结合氧的能力。

在血管内给药前也能用氧气预先装载或饱和不溶性血红蛋白结构。这样可以象冠状血管成形术或肿瘤治疗的短期使用中最大量的送氧。

本发明不溶性血红蛋白结构的疏散“细胞”性能使得它们能够以一种生理学方式运送氧,而与体内的红细胞没有什么不同。由于本发明不溶性血红蛋白结构的“大聚合物”特性,它们产生的胶体渗透压或膨胀压与现有技术中任何等量的(就氧运载量而言)可溶性血红蛋白相比是微不足道的。这就可以把高浓度的本发明血红蛋白结构进行静脉输液,而对现有技术的可溶性血红蛋白来说,由于担心渗透梯度引起血

管周围组织严重的脱水,只能以最大浓度 6—8g/dl 来输液。

本发明还可以扩展到使用其它氧结合蛋白用作 RBC 代用品。作为一个例子,肌红蛋白具有一个单独的氧结合血红素基团(但没有可交联的半胱氨酸残基),应当有与本发明相同方式的作用。具有至少两个可交联的半胱氨酸残基的一种遗传工程产生的肌红蛋白可被用来生成一种不溶性肌红蛋白结构。氧结合蛋白与对氧没有亲和力的蛋白的组合物可以用于形成本发明的不溶性结构,例如可以使用血红蛋白和肌红蛋白。

本发明组合物比现有技术的微囊包裹血红蛋白组合物具有更显著的优点。现有技术的血红蛋白的脂质体制剂在脂质体外壳含有可溶性血红蛋白。现有技术的脂质体包裹血红蛋白组合物具有的一些缺点已被本发明所克服。从脂质体组合物中裂解出的可溶性血红蛋白有可能会引起肾中毒。本发明不溶性结构由于它大范围地交联性质将不会裂解出可溶性血红蛋白。脂质体的聚集已知能激活补体蛋白 C3 $\alpha$ 。如果是不溶性结构,由于它的体积远远大于脂质体的体积范围,这种聚集将是不可能的。

本发明不溶性交联的血红蛋白组合物避免了与现有技术的可溶性血红蛋白组合物有关的毒性。血红蛋白的肾中毒或肾毒性主要是与从循环中清除可溶性二聚物,四聚物,或寡聚物血红蛋白有关。已广泛交联的或“大聚合物”的本发明血红蛋白不能由肾脏清除,因而是不可能有肾毒性的。本发明的不溶性结构不能被肾脏清除,因而解决了这个问题。本

发明广泛交联的血红蛋白结构比现有技术具有的另一个优点是由于其不溶的形式,增加了在血管内的保留特性。

用透射电子显微测定法(TEM)测得不溶性血红蛋白(IHC)的形态。为获得牛IHC的横切片的TEM显微照片,把IHC用戊二醛固定,用四氧化钨和亚铁氰化钾染色(为提供高蛋白浓度区的对照),用一种低粘度树脂包埋并进行超薄切片(片厚为 $\sim 75\text{nm}$ )。由于在这些步骤中可能会有整个直径的一些缩小和IHC的一些形状扭曲,所以IHC的真实直径最好用溶液颗粒大小的分布(3微米;std. dev. 1)来表示,而不是直接测量TEM显微照片。仔细观察TEM显微照片发现三个明确的区域:一个清晰的中心区;一个暗的颗粒薄层;和一个与颗粒外表面相关的松散附着的,分散的,有斑点的灰色区。黑色薄层就是IHC壳。它含有一种高密度蛋白,在染色步骤中,显色最明显。松散附着的灰色物似乎是在样片制备的固定步骤中粘在IHC壳上的天然蛋白。对这个照片和许多其它显微照片的初步测量表明牛血红蛋白的IHC的壳厚约为 $25-35\text{nm}$ 。血红蛋白是一种直径为 $5.5\text{nm}$ 的粗糙的球体蛋白(L. Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman, New York, 1988)。所以,IHC的蛋白外壳大约是血红蛋白分子(四聚物)的4到20倍厚。因此,一个直径为 $3.0\mu\text{m}$ 的泡状物应当能含有大约 $10^4$ 到 $10^{12}$ 个血红蛋白分子。

用圆二色性检测本发明的不溶性血红蛋白结构(IHC)(微泡或微球)发现IHC中 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的含量与纯化的无介质血红蛋白(SFH)并没有明显差别。这种发现十分

重要,因为它表明不溶性血红蛋白的交联步骤和形成没有导致蛋白变性(即,三级和四级结构的改变)。当然用代表合成步骤后保留了可逆性氧结合和氧结合血红素单位之间的协同作用的功能性数据也证实了这种发现。

现已测出了 IHC 的氧结合性能。由于 met-Fe(Ⅲ)形式的血红蛋白不能结合氧,可使用 Hyashi 等人的还原体系(A. Hyashi, T. Suzuki, M. Shin. Biochim. Biophys. Acta 310, 309, 1973)来把 Fe(Ⅲ)还原为 Fe(Ⅱ)。该还原体系是由不同浓度的葡糖—6—磷酸,葡糖—6 磷酸脱氢酶, NADP, 铁氧化还原蛋白,铁氧化还原蛋白还原酶和过氧化氢酶组成。在每次氧结合实验前,向 IHC 中加入该还原体系并在 4℃ 保持 24—36 小时。

按照实施例 14 所述可以合成牛和人的血红蛋白 IHC。象本领域熟练技术人员所知道的,所用的血红蛋白可来源于任何脊椎动物,非脊椎动物或真核源,或者脊椎动物,非脊椎动物或真核细胞的基因操作产物。表 1 提供了本文结果的总结。

表 1

声处理过的 Hb 微泡和未经声处理的 BHb 在不同浓度的磷酸酯中 n 最大和 P<sub>50</sub> 的总结表

效应物浓度 (mM)	声处理的 Hb 微泡				未经声处理的 Hb 溶液			
	IHP		2,3-BPG		IHP		2,3-BPG	
	n 最大值	P1/2	n 最大值	P1/2	n 最大值	P1/2	n 最大值	P1/2
0	9.5	21.2	9.5	21.2	2.7	22.3	2.7	22.3
0.25	12.1	22.2	11.5	22.0	2.7	24.7	2.7	22.5
0.5	15.2	28.3	13.0	25.1	2.8	28.2	2.8	23.2
1.0	15.1	32.1	13.4	28.7	2.8	30.2	2.8	24.9
1.7	17.6	39.5	14.0	32.6	2.8	34.1	2.8	28.0

注: BHb 微泡的希尔系数(n)是按公式计算的:  $n = \frac{\Delta \log(Y/1-Y)}{\Delta \log P_{O_2}}$ , 其中 Y 是氧合部分 而

P<sub>O<sub>2</sub></sub> 是氧压, 对微泡而言, 每项  $\Delta \log(Y/1-Y)$  都是五个连续点的平均值

全部结合实验都是在 25℃ 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (pH7.4) 中进行的。如 IHC 紫外可见光谱所证实的, IHC 保留了它的可逆性结合氧的性能, 这表明有 met-Fe(III), 氧-Fe(II) 和脱氧-Fe(II) 形式存在。IHC 能够在脱氧状态和有氧状态之间循环, 十次以上循环也基本不会被降解。这一点是很重要的, 因为它表明在制备 IHC 红细胞代用品的方法中不会明显改变活性血红素部位周围的环境。

这些氧结合数据表明 IHC 基本上不含有变性血红蛋白。如果它被变性, 就不会(或很少)观察到生理反应性。

在无磷酸酯存在下还原的血红蛋白 IHC 和天然无介质血红蛋白的氧结合曲线在形状上都是 S 形, 这种曲线表明了氧结合的作用性。在两种曲线中 P<sub>50</sub> 值(血红蛋白上存在的氧结合位置有一半结合氧所需的压力)相近(21 托与 22 托)。这种结果表明 IHC 是在与天然血红蛋白相似的氧气压力下

结合并释放氧的。令人吃惊的是, IHC 的最大希尔系数,  $n$  最大值(代表氧结合位置间协同作用的程度)明显高于无介质血红蛋白溶液(9.5 对 2.6; 见图 2)。用下列公式来计算希尔系数( $n$ ):

$$\frac{\Delta \log (Y / 1 - Y)}{\Delta \log P O_2}$$

其中:

$Y$  = 氧合部分, 和

$P O_2$  = 氧分压

用 5 个连续点的平均值获得每个  $(\Delta) \log (Y / 1 - Y)$  值, 然后作一些光滑曲线。

已经证明天然血红蛋白的变构效应物如肌醇六磷酸酯 (IHP) 和 2,3—双磷酸甘油酯 (2,3—BPG) 能够增加  $P_{50}$  (即, 较低氧亲和力) 和提高协同性。IHC 中也可以见到相同的作用。即使用  $P_{50}$  值的增加相同, 也能看到更为引人注目的作用 IHC 的协同性。在 1.7mMIHP (17.6 对 2.8) 和 2,3—BPG (14 对 2.8) 存在下  $n$  最大值比天然血红蛋白有更显著的增加 (见图 3 和表 1)。

协同性上出人意料的较大增强的明显是因为 IHC 壳中血红蛋白四聚物间的共价连接。希尔系数不可能大于相互作用位点数目。天然血红蛋白中大约 2.8 的数值反应了一个四聚物的协同性。尽管如此, 在 IHC 壳中, 一旦结合氧后就有几个交联的四聚物之间有连接 (通过形成二硫键)。最近四聚物之间的相互作用可能是最强的; 然而相距更远的四聚物之

间也存在较弱的相互作用。 $n$  最大值基本上表示结合氧后 IHC 外壳中由脱氧—T 转化到氧—R 状态过程中多个四聚物的协同作用。血红蛋白 IHC 的 TEM 显微照片也反应了大约 6 个血红蛋白聚合物的壳厚度。直径  $20\mu\text{m}$  的泡状物应当能包含大约  $10^4$  到  $10^{12}$  个血红蛋白分子。

用制备后不同时期的颗粒数目来测定 IHC 贮存的稳定性。IHC 可在和生理盐水中  $4^\circ\text{C}$  下存放最多 6 个月。在第 3 个月, IHC 的浓度已经下降大约 10%, 而在第 6 个月, 浓度已下降约 25—30%。

分别在  $37^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  和  $4^\circ\text{C}$  下测出了 IHC 的自身氧化速率(从  $\text{Fe(II)}$  向  $\text{met-Fe(III)}$  转化)是大于 60 小时, 96 小时和 25 天。保持在惰性气体中, 获得这些结果就不需采用特殊的预防保护措施。现有技术清楚地证明保存在象氮气这样的惰性气体中对降低血红蛋白的自身氧化率是有益的。在这种条件下贮藏一个较长时期所保存的  $\text{Fe(II)}$  血红蛋白部分将有极大的增长。

此外, 用如上所述的 Hyashi 等的还原系统贮存 IHC 悬浮液可以防止自身氧化。

我们已研究了用巴氏灭菌作为 IHC 悬浮液最后阶段灭菌的一种方法。使用几种不同的巴氏灭菌条件。用在每种条件下灭菌后的颗粒数目来衡量温度对 IHC 的作用。

条件 1: IHC 悬浮液的温度在 8 分钟内从  $25^\circ\text{C}$  上升到  $62.8^\circ\text{C}$ , 并在这个温度下保持 30 分钟。颗粒数目表明降解低于 20%。



条件 2: IHC 悬浮液的温度在 10 分钟内从 25℃ 上升到 71.7℃ 并在该温度下保持 15 秒。颗粒数目表明有低于 20% 的降解。

条件 3: IHC 悬浮液的温度在 12 分钟内从 25℃ 上升到 89.5℃ 并在该温度下保持 2 秒钟。颗粒数目表明有高于 70% 的严重降解。

所以,发现条件 1 和 2 适合作巴氏灭菌方法。 $\gamma$  射线照射也适合作最后阶段的灭菌方法。

用已知的变构效应物对血红蛋白的化学改性可以改变 IHC 的氧亲和性(或  $P_{50}$ )。对血红蛋白的改性一般都限制了有氧和脱氧这两种构象之间的转换,因此氧合功能几乎总是以某种方式发生改变。例如,在有氧形式下改性血红蛋白,通常对高氧亲和力有好处,而在脱氧条件下进行改性则作用是相反的。由于吡哆醛衍生物分子很象天然变构效应物 2,3-二磷酸甘油吡哆酯(DPG),所以可用吡哆醛衍生物作改性剂。它们能结合血红蛋白末端的氨基。例如通过类似于 2,3-DPG 的自然相互作用的 5'-磷酸吡哆醛(PLP)与血红蛋白反应来增加  $P_{50}$ 。可用作改性剂的还有其它吡哆醛衍生物,如 2-去甲-2-甲酰 PLP(一种能连接血红蛋白  $\beta$  链的双官能团试剂)或者四磷酸双吡哆醛。也可以用其它交联剂如酰基三甲基磷酸钠)来交联  $\beta$  链。

还可以使用醛类改性剂。例如用戊二醛聚合血红蛋白和用戊醛连接 PLP。

双阿司匹林酯例如 3,5-双(二溴水杨基),富马酸和相

应的单阿斯匹林可以用作变构改性剂。阿斯匹林在血红蛋白的 $\alpha$ 链和单官能团试剂之间结合到一个内部赖氨酸上。这二者都能增加血红蛋白的 $P_{50}$ 。

所以,可以制备“低亲和力”或“高亲和力”结构以用于除外伤和急性失血之外的情况,例如在需要局部传送氧并且是有益的情况下使用。

以上技术生产的一种“低亲和力”结构,即具有较高 $P_{50}$ ( $>28\text{mmHg}$ )的结构,已在放射或化学方法治疗肿瘤中使用氧时作为一种辅剂使用。这种结构在体外装载最大容量的氧,然后给药到肿瘤循环中。它使大量氧释放在肿瘤部位。在放射或化学疗法存在下产生的活性氧使肿瘤部位产生较大的细胞毒素活性。

“高亲和力”结构( $P_{50}<28\text{mmHg}$ )适用于“局部缺血的氧输送”。局部缺血或组织缺氧会在许多病理状态中出现,如中风,心肌梗塞等。在这些部位优先释放氧将有助于尽可能减少组织的持续受损。具有与全血相似氧亲和力的氧载体或RBC代用品在这一类部位不会优先释放氧。然而,具有高氧亲和力(即与全血相比 $P_{50}$ 较低)并且因时在正常遇到的氧梯度条件下能保留其大部分氧的结构,由于血和组织间氧梯度较大的缘故交替地在这类局部缺血部位优先释放氧。通过改变交联性质,用一种具有所需亲和力的合适天然血红蛋白,或用基因工程方法获得的具有合适亲和力的血红蛋白可以很容易地操作本发明的不溶性血红蛋白结构的亲和力,以获得一种适合这种使用的数值( $P_{50}$ )。

本发明不溶性血红蛋白结构能制成胶囊,并由此作为药中氧载体(如氟化碳类),药物,诊断剂等的有效载体。被胶囊包裹的氟化碳类(FC)是有效的氧载体,它与氧分压是以线性关系运送的释放溶解的氧,而 IHC 的血红蛋白外壳与氧压却是以 S 形曲线关系运送和释放结合的氧。在同一制剂中血红蛋白和氟化碳的这种特殊结合使体内能够最大地运送和释放氧。

现有技术中都没有公开同时运送血红蛋白(Hb)和氟化碳(FC)能力的技术。在血红蛋白外壳的核内包裹的氟化碳能作为一个氧的贮存库。这种结合使载体结合的氧的运送对压力呈 S 形关系(即对血红蛋白)以及线性关系(即对氟化碳)。此结合也使其对组织  $pO_2$  为线性的“背景”释放氧(从氟化碳)以及 S 型的“团块”(bolus)的氧释放(从血红蛋白)。特别是例如组织局部贫血或肿瘤治疗过程中,短时间内需要大量氧时,它可更有效地进行氧的输送。

Hb/FC 结合可外部监测血管内运送剂量的位置而显示其优点。因为通过 MRI 很容易使  $^{19}F$  核成像,因此很可能觉察血管和组织内运送悬浮液的累积。这在肿瘤治疗中具有很大优点,因在此过程中,氧被同来作为放射或化疗剂的辅助剂,所以它可精确地监视载氧血红蛋白/FC 悬浮液输送到预想的位点。

本发明实践中,有许多氟化碳(FC,)适合使用,详述如下。

此外,无氧的结合力但可交联半胱氨酸残基或巯基(天

然或人工引入)的蛋白质可包裹合适氧亲合性的生物相容氟化碳用作血液替代物。作为其例,血蛋白包裹全氟萘烷或全氟三丙胺用作血液替代品。

有一些药物适合于包裹在本发明血红蛋白微胶囊中。一些化学治疗剂需要有氧存在才可获得最大肿瘤细胞毒性。在一种氧载体如血红蛋白的结构中传送这类药物可以有效地把细胞毒素的基本成分结合进一种单一包装中。许多适用的细胞毒素药物是油溶性的。这些药物可溶于一种氟化碳或者其它生物相容的油中,如大豆油,红花油,椰子油,橄榄油,棉花籽油等。将油/药溶液和一种血红蛋白溶液一起经超声波辐射来生产在一种包裹在交联的不溶性血红蛋白外壳中的油/药微球。在血管内给药前把该悬浮液用氧饱和。油溶性细胞毒性药物包括环磷酰胺,GCNU,左旋溶肉瘤素,自力霉素,紫杉醇及其衍生物,taxotere 及其衍生物,喜树碱,阿霉素,鬼臼乙叉甙,阿莫西芬,长春花碱,新长春碱等;甾体类抗炎剂如:布洛芬、阿斯匹林、吡氧噻嗪、甲氧咪胍等;甾体类如雌激素,氢化泼尼松,可的松,氢化可的松,二氟松等,一些药物如胆甾醇对苯乙酸氮芥,邻氯苯对氯苯二氯乙烷,维沙定(Visadine),卤代亚硝基脲类(helonitrosoureas),蒽环类(anthrocycline),椭圆玫瑰树碱,安定,等;免疫抑制剂如环孢菌素,硫唑嘌呤,FK 506 等。

用双乳化的方法也可以以胶囊的形式把水溶性药物包在IHC壳内。首先,用一种生物相容油乳化药物水溶液得到一种油包水(w/o)乳化液。把w/o乳化液当作油相,并与上

述血红蛋白水溶液一起经受超声波辐射处理,生成壳中含有IHC的所需水溶性药物的微浮化液,适用于本发明这个实施方案的乳化剂包括普卢兰尼克斯(Pluronic)(聚环氧乙烷和聚环氧丙烷的嵌段共聚物),来源蛋黄的磷脂(如卵磷脂,蛋黄卵磷脂等);脂肪酸酯(如,单和双硬脂酸甘油酯,单和双棕榈酸甘油酯等)。用于本发明这个实施方案中的水溶性药物包括抗肿瘤药,如放线菌素,博来霉素,环磷酰胺,葑诺霉素(duanorubicin),阿霉素,艾波霉素(epirubicin),氟尿嘧啶,碳铂(carboplatin),顺氯氨铂,干扰素,白芥素,氮甲叶酸,自力霉素,它莫西芬,雌激素,孕激素等。

双乳化方法也适合于传送其它水溶性治疗剂,诊断剂或有营养价值的物质。例如,以胶囊形式把血红蛋白微乳化液包裹于IHC中可以增加IHC中的血红蛋白的含量。

为了使IHC更象红细胞,可在交联的血红蛋白微泡周围形成磷脂双层。这类双层形成了一种真正的“红细胞类似物”,并可在两步骤工艺中生成用于形成这种双层结构的带电荷磷脂或脂类包括磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰丝氨酸,磷脂酰肌醇,磷脂酰甘油,神经鞘髓磷脂,双十四烷基磷酸,双十六烷基磷酸,肌氨酸酯(肌氨酸胺),甜菜碱,单体和双体醇酸等。在本发明中也可以使用非离子脂类,它包括聚乙烯脂肪酸酯,聚乙烯脂肪酸醚,二乙醇酰胺,长链酰基己糖酰胺,长链酰基氨基酸酰胺,长链氨基酸胺,聚氧乙烯山梨糖醇酯,聚氧单甘油酯和双甘油酯,单和双硬脂酸酯甘油酯,单和双油酸甘油酯,单和双棕榈酸甘油酯

该技术上的另外一个变化是使用可光聚合的脂类或经化学反应容易被交联的脂类来生产一种更加稳定的脂类“膜”包衣。可用于本发明中的可光聚合的脂类有丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯取代的脂类(如,磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰丝氨酸,磷脂酰甘油,双十四烷基磷酸,双十六烷基磷酸等),具有天然可聚合的不饱和的脂类(如具有丙二醛基或可连接的双烯基的不饱和的磷脂酰胆碱等),等等。经硫代—二硫化物交换容易进行交联的脂类也适合于形成IHC的稳定脂类包衣。这种脂类的例子有用硫辛酸酯化的磷脂酰胆碱的衍生物,等等。

以超声波辐射合成的IHC类可以按如上所述以在生物相容介质中的混悬液形成给药,也可以与其他营养剂一起给药。

体内给药的优选途径是静脉内,动脉内,肌肉内,皮下,腹膜内,口腔内,吸入,局部,透皮,栓剂,阴道栓等给药途径。

总之,本发明不溶性血红蛋白结构比现有技术的可溶性血红蛋白,用胶囊包裹的可溶性血红蛋白,氟化碳血液代用品或氧载体有许多优点。这些优点包括:

- 较高的氧容量;
- 可变的氧亲和力;
- 不溶性“大聚合物”血红蛋白,它比现有技术中的四聚物或寡聚物的可溶性血红蛋白可在循环中保留较长时间;
- 由于分子体积较大而具有较低可能性的肾细胞毒性;
- 血红蛋白渗漏的可能性比脂质体包裹的血红蛋白更

小;

—由于它的体积比脂质体更大,所以不可能有激发补体蛋白的聚集物形成;

—与现有技术的可溶性血红蛋白相比,由于其独立的“细胞”性,其作用更象 RBC;

—在运载与血红蛋白结合的氧的同时还能运送一个未结合氧的贮存库;

—能作为不含有潜伏变态反应性和毒性乳化剂的一种氟化碳(FC)载体;

—Hb/FC 结构中的交联血红蛋白能提供比现有技术中使用卵磷脂和/或其它合成表面活性剂的乳化系统更强的稳定性;

—从 Hb/FC 的氧释放曲线是与组织  $pO_2$  有关的一种 S 形和线形结合的曲线;

—可用  $^{19}F$  MRI 体内测定和监控 Hb/FC 结构;

—除了运送氧外,血红蛋白或 Hb/FC 结构也可用作药物载体;

—可以将脂类双层膜用于血红蛋白结构,使其更象生理结构;

—用聚合物如 PEG 改性血红蛋白结构来进一步增加血管内的保留时间。

本发明的另一方面,可以将一般是疏水的,与水不混容的这种难以给药的含有机氟化合物包裹在聚合物外壳中(如上所述),使其容易地传送。用聚合物外壳包裹的含有机氟

化合物是容易使用的,并且是生物相容的。按照本发明所生产的聚合物壳体颗粒大小有大约2微米的平均直径,因为它用于静脉内或动脉内注射没有小血管堵塞并随后引起组织损伤(例如由于局部失血而引起氧丢失)的危险,所以医学应用是最理想的,相比较起来,红细胞直径大约是8微米(所以为防止血管堵塞注射性生物材料的直径应当小于8—10微米。

天然产生的氟原子( $^{19}\text{F}$ )能给出一个清晰的核磁共振信号,所以在MRI中能作为对比剂或“探针”使用 $^{19}\text{F}$ 的特殊优点包括:1)在体内的天然浓度相当低(一般在体内不存在氟),2)核磁共振的高敏感性,3)与 $^1\text{H}$ 相近的磁旋比,所以仅对现有的MRI装置作微小改动就能用来使 $^{19}\text{F}$ 磁共振成像,以及4)多数含有机氟化合物毒性低。

氟化碳一般无毒,并且是生物相容的。由于氟化碳的碳—氟键较强(约130kcal/摩尔),所以它是稳定的,并不具有反应性的,因此,也不可能被代谢。相比而言,C—H键(约100千卡/摩尔)较弱并有反应性较强,FDA已批准了两种氟化碳,全氟三丙胺和全氟萘烷,以商品名Fluosol DA作为血液代用品在医学上使用。

在实施本发明中能够使用许多不同的氟化碳。例如,可把符合下列通式的化合物混入本文所述的本发明方法所用的聚合物外壳中:

(a)  $\text{C}_x \text{F}_{2x+y-z} \text{A}_z$ , 其中

$x=1-0$ , 优选5—15,



$y=2$ ; 或当  $X \geq 2$  时,  $y=0$  或  $-2$ ; 或者当  $x \geq 4$  时,  $y=-4$ ,

$z=0$  到  $(2x+y-1)$  的任何整数; 和

A 选自于 H, 除 F 外的卤素,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{OR}$ , 其中 R 是 H, 烷基, 氟烷基, 链烯基, 氟代链烯基, 炔基, 氟代炔基, 芳香基, 氟代芳香基, 烷醇基, 氟代烷醇基, 烯醇基, 氟代烯醇基, 炔醇基, 氟代炔醇基

(b)  $[\text{C}_x\text{F}_{2x+y-z}\text{A}_z]_a\text{JR}_{b-a}$ , 其中

X, Z, A 和 R 如上所定义,

$Y'=+1$ ; 当  $X \geq 2$  时  $Y'=-1$  或  $-3$ ; 当  $X \geq 4$  时  $Y'=-5$ ,

$J=\text{O}, \text{S}, \text{N}, \text{P}, \text{Al}$  或  $\text{Si}$ ,

$a=1, 2, 3$  或  $4$ , 和

$b$ =对二价 J 是 2, 或

对三价 J 是 3,

对四价 J 是 4,

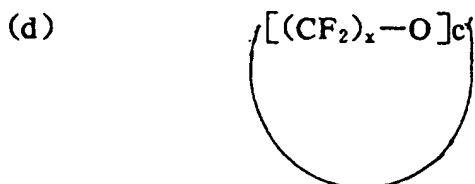
(c)  $\text{A}'-[(\text{CF}_2)_x-\text{O}]_c-\text{A}''$ , 其中:

X 如上所定义,

A' 选自于 H, 卤原子,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{OR}$ , 其中 R 是 H, 烷基, 氟烷基, 链烯基, 氟代链烯基, 炔基, 氟代炔基, 芳香基, 氟代芳香基, 烷醇基, 氟代烷醇基, 烯醇基, 氟代烯醇基, 炔醇基, 氟代炔醇基,

A'' 选自 H 或 R, 其中 R 如上所定义,

$C=1-200$ , 优选  $2-50$ , 或



其中：

X 如上所定义，而

$c' = 2-20$ ，优选  $2-8$ ，

以及它们中任意两种或多种混合物。

上述通式中所包括的是具有如下通式的化合物：

$C_xF_{2x}$ ，例如，全氟-1-己烯 ( $C_6F_{12}$ )，全氟-正己烯 ( $C_6F_{12}$ )，全氟-3-己烯 ( $C_6F_{12}$ ) 等；

环状- $C_xF_{2x}$ ，例如，全氟环己烷 ( $C_6F_{12}$ )，全氟环辛烷 ( $C_8F_{16}$ ) 等，

$C_xF_{2x-2}$ ，例如，全氟-1-己炔 ( $C_6F_{10}$ )，全氟-2-己炔 ( $C_6F_{10}$ )，全氟-3-己炔 ( $C_6F_{10}$ ) 等，

双环- $C_xF_{2x-2}$ ，例如全氟萘烷 ( $C_{10}F_{18}$ ) 等，

$C_xF_{2x+2}$ ，例如，全氟己烷 ( $C_6F_{14}$ )，全氟辛烷 ( $C_8F_{18}$ )，全氟壬烷 ( $C_9F_{20}$ )，全氟癸烷 ( $C_{10}F_{22}$ )，全氟十二烷 ( $C_{12}F_{26}$ ) 等，

$C_xF_{2x-4}$  例如，全氟-2,4-己二烯等，

$C_xF_{2x+1}A$ ，例如，全氟三丙胺 [ $(C_3F_7)_3N$ ]，全氟三丁胺，全氟三叔丁胺，等，

$C_xF_{2x-2}A_2$ ，例如， $C_{10}F_{18}H_2$ ，等，

以及这类高度氟化的化合物如全氟-1,2-二氢化茚，全氟

甲基金刚烷,全氟辛基溴,全氟二甲基环辛烷,全氟环辛溴,全氟冠醚等。

除了如上所述的直链,支链和环状含氟化合物外,在实施本发明中还可以使用氟化冠醚(如,全氟-12-冠-4,全氟15-冠-5,全氟18-冠-6等)。

为了获得具有较高信号噪声比的好的磁共振图像,使用大量等价氟是有益的,这里所用的术语“等价氟”是指那些含氟化合物的存在于基本上类似的微环境(即;基本上相似的磁环境)中的氟取代基,等价氟将会产生一个显像信号。大量等价氟将会产生一个不被“非等价”氟的对抗信号冲淡的强信号。

这里所用术语“非等价氟”是指那些与相同含氟化合物上的其他氟取代基相比存在于基本上不相似的微环境(即基本上不相似的磁环境)中的含氟化合物的氟取代基。因此,与等价氟相比,非等价氟由于其不同的化学位移会产生多个信号。所以,尽管具有大量非等价氟的化合物可以满足MRI的应用,但要获得最佳的图像这些化合物是不理想的。

对于血管显像的应用特别有意义的是具有延长了循环时间的含氟化碳聚合物外壳。目前所用的血管照像技术使用X—射线对比剂,这是一种损伤性的方法。近来已证实<sup>1</sup>H—MRI能够用于血管照像术[Edelman和Warach, New England J. of Medicine 328:785—791(1993)]。同样地,<sup>19</sup>F—MRI适用于血管照像术,并具有许多优点,例如能获得与周围组织(它不含任何天然氟)参照的较强烈的对比。可应用这

种方法的例子有诊断和鉴别颅内动脉瘤,动静脉畸形,上腔静脉闭塞,下腔静脉闭塞,门静脉闭塞,盆腔静脉闭塞,肾静脉闭塞,肾肠系膜动脉闭塞,外周肠系膜动脉闭塞等。

按照本发明用聚合物外壳包裹的含氟化合物能用于各种目的,如,获得各种器官和/或组织的磁共振图像,获得器官和/或组织的氟分布情况,以及测量局部温度。本发明对比剂并不仅局限在MRI的使用,而且也能用于超声波扫描术和放射学的使用中。氟的其它同位素 $^{18}\text{F}$ 也能用作正电子放射X线体层照相中(PET)的对比剂。所以,使用一种含氟对比剂,能够进行PET和MRI两种诊断。也能捕获用于放射对比剂中的其它显影剂如钆和铈化合物。这类对比剂的两个例子是神经松弛剂(Neurolite)和心松弛剂(Cardiolite)。

使用本发明组合物测定氧是基于在顺磁物质如氧的存在下 $^{19}\text{F}$ 的NMR松弛率的显著变化。由于氧是顺磁性的,它将与氟核相互作用,增加 $^{19}\text{F}$ 从激发态到正常态的松弛率。用监控这种松弛率变化的方法,能够测定局部区域的氧浓度(把MRI信号校准到一个已知氧浓度)。

例如,这种体系的新颖性在于1)使用MRI能获得氧的信息;2)利用氧的顺磁性影响 $^{19}\text{F}$ MRI(NMR)信号;3)使用聚合物外壳提供一个对氧也具有通透性的恒定的保护性环境等等。

通过使用经过生理温度范围内的相变的固体含氟化合物(如,高分子量的化合物,或含氟化合物的混合物),也能使用MRI测量局部温度。固体比液体的松弛时间更长。所以

当达到相变转化(即,从固体到液体)时,松弛时间将显著降低。在固体到液体的相变中可观察到NMR谱的显著变化。把指定含氟化合物的MRI信号形状可以校正到一个已知温度。通过使用聚合物外壳内的高分子量含氟化合物(即,具有 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 熔点的含氟化合物),或者通过使用一种聚合物外壳内的含氟化合物与非氟化合物的混合物,来选择聚合物外壳的内含物,以提供一种发生相变所需的温度范围(一般在约 $22-55^{\circ}\text{C}$ 范围内)。该壳内的氟化碳将在指定温度范围内经过从固体到液体的相变,随之也改变所观察到的松弛率,这样就可以测定体内温度。局部温度数据将是特别有用的,例如在癌症的高体温治疗中监控患者或者在测定癌细胞中(癌细胞比正常细胞更冷)使用。

所使用的含氟组合物将决定相变的温度范围。所以,只是简单地通过改变含氟组合物的组分即可在较宽的温度范围内使用这种技术。例如,在一种聚合物外壳中包裹的纯全氟十二烷( $\text{C}_{12}\text{F}_{26}$ )将在氟化碳的熔点( $75^{\circ}\text{C}$ )进行固体到液体的相变。然而,这种转变是急速的,只能得到少量的温度数据。为得到大量的数据,可以把含氟组合物的熔点扩大到较宽范围内,例如,只是简单地向纯的含氟组合物中加入其它组分。现有技术中众所周知混合物比相应纯的组分有较低的和较宽的熔点范围。所以,例如,用一种较低分子量的氟化碳配制成的全氟十二烷将会加宽用胶囊形式包裹的组合物的熔点范围。相似地,用一种烷烃(如戊烷)和含氟化合物(如,全氟十二烷)的混合物将会加宽包裹组合物的熔点范围。

此外,在实施本发明中也能使用化学加成氟的化学改性长链脂肪酸(如,正十七烷酸 $[C_{17}H_{34}O_2]$ ,十九烷酸 $[C_{19}H_{38}O_2]$ 等),醇类(如十九烷醇 $[C_{19}H_{40}O]$ ,二十二烷醇 $[C_{22}H_{46}O]$ 等)。例如,全氟一叔一丁醇( $t-[C_4F_9-OH]$ ;PCR CHEMICALS)]与上述任意反应性含氧化合物之间的脱水偶联反应将会产生经过固体到液体相变的一个分子,和一个具有9个等价氟的分子。同样,例如,一种氟化脂肪酸加宽熔点范围,由此可用于进行局部温度的测定。

这种温度测定体系的新颖性在于,例如 1)可使用 MRI 获得空间分解的温度数据,2)利用温度与 MRI(NMR)信号的依赖关系,3)使用了在指定温度范围经过固体到液体相变的一种含氟化碳组合物,4)使用了聚合物外壳对介质提供恒定和保护性的环境,和 4)在得到形态数据的同时可得到温度数据。

按照本发明,在一个截面直径不大于约 10 微米(这里使用的术语“微米”是指毫米的千分之一测量单位)的壳内包裹含氟组合物的颗粒。较优选截面直径小于 5 微米,而对静脉内途径给药来说目前最优选的是小于 1 微米的截面直径。

根据显像的需要可用各种方式把本发明的对比剂引入体内部位。例如,由口腔摄取或栓剂形式把悬浮水溶液导入胃肠道(如,以获得到胃和胃肠道的显像),注射到非血管部位如脑脊髓腔,或者注射到血管系统或特定器官的脉管如冠状动脉中。此外,也能把本发明对比剂注射到其它身体部位,如前,后眼腔,耳朵,膀胱(如,通过尿道),腹膜腔,输尿管,尿

道肾盂,骨关节腔,淋巴管,蛛网膜下腔,脑室腔,心室腔等。

含有氟组合物的固体或液体核的聚合物外壳能以相对小的体积直接传送高剂量的含氟组合物试剂。这就减少了患者在接受大量液体时的不适。

按照本发明的其它实施方案,提供了一种对现有文献中没有描述过的基本水不溶性药物如紫杉醇给药问题的解决方法。所以,我们已经发现用微米大小颗粒的水悬浮液,或含有这种药物颗粒或溶于生物相容非水液体中的药物的水悬浮液,能够完成这类药物的传送。这种方法有利于传送高浓度的这类药物,并由此避免了乳化剂的使用和其相关的毒副作用。

按照本发明的又一个实施方案,通过一种新的含药组合物可以改进上述的给药方式,其中把基本上不溶于水的药物如紫杉醇悬浮在一种生物相容液体中,并且所得到的悬浮液含有截面尺寸不大于10微米左右的这类药物(如紫杉醇)的颗粒,用不同方法如研磨,喷雾干燥,沉淀,超声波辐射等能获得小于10微米的所需大小颗粒。

由于常规方法得到的不溶于水的药物如紫杉醇的晶体大小大于20微米,所以这种药物(如紫杉醇)的固体颗粒尚没有以生理盐水这类载体的悬浮液形式传送。然而,本发明却公开了把基本不溶于水的药物(如紫杉醇)研成大小低于10微米左右,优选低于5微米左右,最优选低于1微米左右的颗粒,并以该颗粒的悬浮液的传送给药,其中所述的颗粒大小能以悬浮液形式进行静脉内传送而没有器官和组织微

循环堵塞的危险。

由于被传送药物的微粒特性,具有网状内皮组织系统的器官如脾、肝、和肺能够从循环中将多数药物清除。这就使得颗粒形式的生理活性剂能够达到体内的这些部位。

在这个实施方案中所用的生物相容液体与上述那些相同。此外,非肠道营养剂如 Intralipid(用作非肠道营养剂的商业上可买到的脂肪乳化液的商品名;可从 Kabi vitrum, Inc., Clayton, North Carolina 买到), Nutralipid(用作非肠道营养剂的商业上可买到的脂肪乳化液的商品名;可从 McGaw, Irvine, California 买到), Liposyn III(用作非肠道营养剂的可从商业上买到的脂肪乳化液的商品名(含有 20% 大豆油, 1.2% 卵磷脂和 2.5% 甘油);可从 Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois 买到), 等可用作该药物颗粒的载体。或者,如果生物相容液体含有象大豆油这样的溶解药物的物质(如,象 Intralipid 中),药物可部分或全部溶于载体液体中,有助于它的传送。这种情况的例子是用 Intralipid 作载体传送紫杉醇。在这里用于该实施方案的优选生物相容液体是非肠道营养剂,如上所描述的那些。

根据本发明的另一个实施方案,还提供了一种用于体内传送紫杉醇的组合物,其中将紫杉醇溶于一种非肠道营养剂中。

本发明将通过下列非限定性实施例来更详细地说明。

#### 实施例 1

#### 含油的蛋白外壳的制备



将 3ml USP(美国药典)5%人血清白蛋白(Alpha 治疗公司)溶液置入放有声波探子(Heat System XL2020 型)的圆柱形试管。在白蛋白溶液上覆盖 6.5ml 的 USP 等级的豆油(大豆油)。将声波探子的尖端放于两溶液的界面,并把此组合装置保持在 20℃的冷浴中。使此系统平衡后,声波装置开通 30 秒。强烈混合得到一种白色乳状悬浮液。将悬浮液用生理盐水稀释成 1:5。利用颗粒计数器(颗粒数据系统 Elzone, 280PC 型)测定含油蛋白壳的大小分布和浓度。测定后的蛋白壳被确定具有约  $1.35 \pm 0.73$  微米的最大横径,其在原悬浮液的浓度为  $\sim 10^9$  个/ml 外壳。

作为对照,使上述组合物中不含蛋白,当受到超声辐射时则不能形成稳定的微乳化液。此结果表明,对于微球体的形成,蛋白是必不可少的。此将通过如下所述的电子显微照片观察和透射式电子显微镜研究得到证实。

## 实施例 2

### 影响聚合物外壳形成的参数

对几种变量,如蛋白浓度、温度、声波处理时间、管理活性剂的浓度和声波强度进行测试,以便获得聚合物外壳的最佳制备方式。这些参数通过含有甲苯的交联牛血清白蛋白外壳进行确定。

用颗粒计数器测定由蛋白浓度为 1%、2.5%、5%和 10%的溶液制备的聚合物外壳的大小和数量的变化,发现聚

合物外壳的大小不随蛋白浓度的变化而大幅度地改变,但是每 ml 由“乳状悬浮液制备的聚合物外壳的数量,在 5% 浓度以下随蛋白浓度的增加而增加。未发现在此蛋白浓度以上,聚合物外壳的数量产生显著的变化。

对于聚合物外壳的最佳制备,发现试管最初温度是重要的。典型地,最初试管温度保持在 0~45℃ 之间。用于聚合物外壳形成的油的水油界面张力是一个重要参数,它也以温度的函数形式而变化。药理活性剂对蛋白外壳的产生没有重要的影响。不管药理活性剂是以溶解状态加入,还是悬浮于分散介质中,它是相对不重要的。

声波处理时间是决定每 ml 所产生的聚合物外壳数量的重要因素。发现声波处理时间大于 3 分钟,聚合物外壳总量则减少,说明过度的声波处理可能导致聚合物外壳的破坏,声波处理时间少于 3 分钟,则产生足够数量的聚合物外壳。

按照发声器生产厂家提供的列线图,此外使用的发声器超声功率大约为 150w/cm<sup>2</sup>。应用三种逐渐增高的功率设定,发现最高功率的功率设定产生的聚合物外壳数量最多。

### 实施例 3

#### 含溶解紫杉醇的聚合物外壳的制备

将紫杉醇以 2mg/ml 的浓度溶解在 USP 等级豆油中。  
将 3ml USP 5% 人血清白蛋白溶液置于连接有声波探子的

圆柱形试管中。在白蛋白溶液上覆盖 6.5ml 豆油/紫杉醇溶液, 声波探子尖端置于两溶液的界面上。使此组合进行平衡, 发声器开通 30 秒。强烈混合, 得到一种稳定的白色乳状悬浮液, 其中含有包裹了/油紫杉醇溶液的蛋白壁聚合物外壳。

为获得此交联蛋白外壳的较高载荷量, 将一种油和药物的互溶剂(药物在其中有相当大的溶解度)与油混合在一起。只要此互溶剂相对无毒(例如乙酸乙酯), 它便可以同原始载体一起注射, 另一方面, 可以在聚合物外壳制备之后, 通过真空下液体的蒸发而被去除。

#### 实施例 4

##### 聚合物外壳的稳定性

在 3 种不同温度下(即 4°C、25°C 和 38°C), 分析已知浓度的聚合物外壳悬浮液的稳定性。通过特定时间内颗粒数的改变来测定其稳定性。如上所述(参照实施例 1)制备出含有豆油的交联蛋白(白蛋白)外壳, 在盐水中稀释, 使最后的油浓度达到 20%, 并在上述温度下保存。所获得的每个样品的颗粒数(Elzone)与时间的函数总结于表 2 中。

表 2

天数	盐水中蛋白外壳		
	4℃	25℃	38℃
0	7.9	8.9	8.1
1	7.4	6.9	6.8
7	7.3	8.3	5.0
9	7.8	8.1	5.8
17	7.8	8.3	6.1
23	6.9	7.8	7.4
27	7.2	8.8	7.1

上面的数据说明:经过实验时间,所计数的颗粒(即聚合物外壳)的浓度仍保持相当恒定。相当恒定的范围在  $7-9 \times 10^{10}/\text{ml}$  之间。它表明,在经过几乎四周的时间,在不同的温度下,聚合物外壳具有良好的稳定性。

#### 实施例 5

##### 活体内生物分布——含有荧光团的交联蛋白外壳

为确定静脉内注射后,包裹在蛋白聚合物外壳体内的液体的摄取及生物分布,将一种荧光染料(红荧烯,从 Aldrich 中得到)包裹在人血清白蛋白(HSA)聚合物外壳体内,用作

一种标记物。这样,将红荧烯溶解于甲苯中,通过如上所述的超声辐射制备出含有甲苯/红荧烯的交联白蛋白外壳。所得的乳状悬浮液在生理盐水中稀释5倍。然后将2ml稀释后的悬浮液以10分钟的速率注射入小鼠的尾静脉。在注射后1小时处死一只动物,另一个在注射24小时后处死。在荧光显微镜下检查肺、肝、胃、脾、骨髓的100微米冷冻切片,以确定包裹了荧光染料或释放了染料的聚合物外壳的存在。在1小时的时候,大多数聚合物外壳是完整的(即呈现明亮的荧光颗粒,直径大约1微米),并且位于肺和肝内。24小时的切片,染料在肺、肝、脾、骨髓中都能观察到。对普通的组织染色进行了观察,显示聚合物外壳的壳壁已经被水解(消化),染料从中释放出来。此与预期的结果相一致,说明本发明组合物具有延缓和控制内容药物活性剂(如紫杉醇)释放的潜在用途。

#### 实施例6

##### 含有豆油(SBO)的聚合物外壳的毒性

如实施例1所述制备含豆油的聚合物外壳,在生理盐水中稀释为两种不同的溶液,一种含20%豆油,另一种含30%豆油。

内脂,一种商业上可得到的 TPN 剂,含有 20%豆油(SBO)。当以1毫升/分钟的速度注射内脂时,小鼠的半数致死量是120ml/kg,或者说对于1个30g的小鼠大约为4ml。

用含有豆油的本发明组合物对两组小鼠(3个为1组,每个重约30g)作如下处理。给每个小鼠注射4ml制备的含豆油聚合物外壳的悬浮液。一组中的每个小鼠接受含20% SBO的悬浮液,另一组的每个小鼠接受含30% SBO的悬浮液。

如此处理后,接受含20% SBO悬浮液组中的3个小鼠全部存活,并且在SBO处理后一周观察,所有组织或器官均未显示肉眼所见毒性。接受含30% SBO悬浮液的一组三个小鼠中仅有1个在注射后死亡。此结果清楚地表明,按本发明聚合物外壳内所含的油,与商业上可得到的SBO制剂(内脂)相比,在它的半数致死量时是无毒的。此作用可能是由于聚合物外壳内的油的缓慢释放(即控制的生物利用率)的结果。与商业上可得到的高油量的乳剂相比,如此的缓慢释放阻止了油的致死量的出现。

#### 实施例7

##### 从聚合物外壳中释放的豆油的活体生物利用率

在向鼠血流中注射聚合物外壳悬浮液后,进行一项试验以确定被聚合物外壳包裹的物质的缓慢或持续释放。通过如上所述的声波处理,制备含有豆油(SBO)的交联蛋白(白蛋白)壁的聚合物外壳。用生理盐水将所得到的含油的聚合物外壳混悬液稀释成最终含20%油的混悬液。用10多分钟将5ml此种悬浮液注入有插管的小鼠颈外静脉中。在注射后的

几个时间点,从这些小鼠采血,并通过常规分析确定血中甘油三酯的含量(豆油主要是甘油三酯)。

用 5ml 商业上可得到的脂肪乳剂(内脂,一种含水非肠道营养剂—含有 20%豆油,1.2%蛋黄卵磷脂和 2.25%甘油)作对照物。此对照物利用卵磷脂作为乳化剂,以稳定此乳剂。这两种情况下的甘油三酯的血清水平的比较将得出作为时间函数的油的生物利用率的直接比较。除含油 20%的聚合物外壳悬浮液以外,还注射 5ml 生理盐水稀释的最终浓度为含油 30%的聚合物外壳悬浮液样品。三个组中,每个组使用 2 个小鼠。将每种情况下血中甘油三酯水平列于表 3 中,其单位为 mg/dl。

表 3

组	血清甘油三酯					
	注射前	1 小时	4 小时	24 小时	48 小时	72 小时
内脂对照物(20% SBO)	11.4	941.9	382.9	145.0	8.8	23.8
聚合物外壳(20% SBO)	24.8	46.7	43.8	29.3	24.2	43.4
聚合物外壳(30% SBO)	33.4	56.1	134.5	83.2	34.3	33.9

标有“注射前”的一栏中表示注射前血中甘油三酯水平。很明显,对于内脂对照物,可以看到注射后甘油三酯水平很高,大约需要 24 小时的时间甘油三酯开始降到注射前水平。可见,这种油在注射后能被立即利用于代谢中。

与内脂含有相同油总量(20%)的含油聚合物外壳悬浮液,其血清中可测得的甘油三酯则显示出一种很不同的利用

率。其含量升高到其正常值的 2 倍左右,并且在此水平上维持好几小时。这表明甘油三酯以一个相当接近于正常值的水平缓慢或持续地释放入血。接受含油 30% 的聚合物外壳组显示较高甘油三酯水平(伴随较高的给药量),并在 48 小时内降至正常。重复一次,与接受内脂的对照组相比,此组中血甘油三酯水平没有极大的升高。这又一次表明了本发明组合物中油的缓慢和持续释放,其优点是避免了聚合物外壳内物质的危险性高血浓度,并且以可接受的水平在较长时间内被利用。

很明显,本发明的聚合物外壳内所传送的药物也将具有同样的优越性。

这种含豆油的聚合物外壳系统可悬浮于一种由氨基酸、基本电解质、维生素和糖组成的水溶液中,以构成一种全胃肠外营养剂(TPN)。这种 TPN 不能用目前常用的脂肪乳(如内脂)来制成,因为有电解质存在的乳剂是不稳定的。

### 实施例 8

#### 含有药物活性剂固体核心的交联蛋白壁聚合外壳的制备

在聚合物外壳内传送水难溶性药物(如紫杉醇)的另一种方法是制备一种包裹有固体药物核心的聚合物外壳。这种“蛋白包衣”药物颗粒可按下述方法获得。重复实施例 3 中所描述的步骤,使用有机溶剂溶解紫杉醇达到较高浓度。通常使用的溶剂是有机溶剂,如苯、甲苯、己烷、乙醚等。聚合物外



壳的制备如实施例3。将5ml含溶解紫杉醇的聚合物外壳乳状悬浮液用生理盐水稀释至10ml。将此悬浮液放入室温的旋转式蒸发器中,挥发性的有机物通过真空而被去除。在旋转式蒸发器中2小时后,在显微镜下观察,这些聚合物外壳暴露出模糊的核心,这表明基本上所有有机溶剂确实已被除去而固体紫杉醇存在于蛋白壳内。

还可以将带有有机溶剂溶解的药物核心的聚合物外壳冷冻干燥,以获得一种不干碎粉末,它能在使用时再次悬浮于盐水中(或其它适宜的液体中)。如果是在室温下不能保持固态的药物,可获得液体核心聚合物外壳。这种方法可以用来制备含非稀释药物的交联蛋白壁壳体。颗粒大小分析显示这些聚合物外壳比含油的聚合物外壳小。尽管目前用于制备聚合物外壳的优选蛋白是白蛋白,其实其它蛋白如 $\alpha$ -2-巨球蛋白,一种已知的调理素,也可用来增加巨噬细胞对聚合物外壳的摄取量。还可以,在形成聚合物外壳过程中将PEG—疏基加入其中,以产生一种可延长体内循环时间的聚合物外壳。

### 实施例9

#### 聚合物外壳在体内的循环及释放动力学

按上述(见,实施例3)制备含紫杉醇的固体核心聚合物外壳,并悬浮于生理盐水中。用下述的HPLC来测定悬浮液中紫杉醇的浓度。首先,聚合物外壳内的紫杉醇被加入的

0.1M 巯基乙醇游离出来(引起蛋白二硫交联键的互换,并破坏聚合物外壳的交联);然后,用乙腈将游离的紫杉醇从悬浮液中提取出来。离心所得的混合液,并将其上清液冻干。将冻干物溶解于甲醇中,并注射于HPLC上,以确定悬浮液中紫杉醇的浓度,大约为1.6mg/ml。

通过颈静脉导管给小鼠注射此悬浮液2ml,2小时处死此动物,并通过HPLC测定存在于肝脏中的紫杉醇量。此需要对肝脏进行均浆,然后用乙腈提取,在离心后冻干上清液。将冻干物溶解于甲醇中,并注射于HPLC上。从2小时的肝脏中回收了约给药量15%的紫杉醇。显示出肝脏的有效剂量。此结果与已知的肝脏网状内皮系统从血中清除小颗粒的功能相一致。

#### 实施例10

##### 交联PEG—壁聚合物外壳的制备

制备含巯基的聚乙二醇,它是制备本发明聚合物外壳的含巯基蛋白的替代物,或是制备本发明聚合物外壳的添加剂。已知PEG对细胞无毒性、无炎性、无粘连性,并且通常无生物活性。曾将它连接于蛋白上以减少其抗原性,连接于构成脂类的脂质体上可以延长它们在体内的循环时间。因此,将PEG结合于基本蛋白壳,可以预期地延长聚合物外壳的循环时间和提高其稳定性。通过改变加入到5%白蛋白溶液中的巯基聚乙二醇的浓度,有可能获得具有不同体内稳定性

的聚合物外壳。可以通过文献中可得到的技术制备巯基聚乙二醇(如 Harris 和 Herati 的技术,公开于 Polymer Preprints Vol. 32: 154—155(1991))。

将分子量 2000g/mol 的巯基聚乙二醇以 1%(0.1g 加入 10ml 中)的浓度溶解于 5% 的白蛋白溶液中。在此蛋白/PEG 溶液上覆盖如实施例 1 所述的油,并于声处理后产生带有由交联蛋白和 PEG 构成的壳壁的含油聚合物外壳。按实施例 4 所述检验这些聚合物外壳的稳定性。

可被巯基修饰并用来替代 PEG 的其它水溶性合成聚合物包括:聚乙烯醇、异丁烯酸聚羟乙酯、聚丙烯酸、聚乙烯恶唑啉、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、多糖等(如:聚氨基葡萄糖、藻酸盐、透明质酸、右旋糖酐、淀粉、果胶等)。

例如,可延长体内循环时间的含碳氟化物的蛋白壳,对血管系统成像特别有益。与壳壁中不含 PEG 的外壳相比,这些壳体在延长期中仍保留在循环中。例如,它可使心脏循环直观化,并提供一种非损伤性的评价冠状循环的方法,代替了如血管造影术这样的传统损伤性技术。

### 实施例 11

通过含免疫抑制剂聚合物壳体的静脉给药将免疫抑制剂传送到移植器官

免疫抑制剂广泛应用于如下的器官移植中以防止排斥反应的发生。特别是,环孢菌素(Cyclosporine),一种有效的

免疫抑制剂,可延长同种异体移植的存活时间,包括:皮肤、心脏、肾脏、胰腺、骨髓、小肠和肺的移植。已证明环孢菌素可抑制某些体液免疫和在更大程度上抑制细胞调节的反应如同种移植排斥反应、迟发型过敏反应、试验性过敏性脑脊髓炎、布氏佐剂关节炎和许多动物品种中不同器官的移植物对抗宿主的移植性疾病。使用环孢菌素已在人体中成功地进行了肾、肝和心脏的同种异体移植。

环孢菌素目前以口服给药,可以是以含环孢菌素溶液的胶囊形式给药,该环孢菌素溶液可以是它的乙醇溶液和油溶液(如玉米油、聚氧乙烯化的甘油酯等),也可以环孢菌素的橄榄油、聚氧乙烯化的甘油酯等的溶液形式给药。它也可以通过静脉注射给药,这种情况下它被溶解于乙醇(约30%)和Cremaphor(聚氧乙烯化的蓖麻油)溶液中,注射前必须在生理盐水或5%葡萄糖中稀释为1:20至1:100。与静脉输注相比,口服溶液的绝对生物利用率大约是3%(Sandoz Pharmaceutica Corporation, PublicationSDI—Z10(A4), 1990)。通常,环孢菌素的静脉给药与目前使用的紫杉醇静脉给药存在着相似的问题,即被认为是由静脉给药载体Cremaphor引起的过敏和变态反应。另外,如此所述用胶囊包裹药物(如环孢菌素)的静脉给药,可避免给药后立即出现危险的血液峰值。例如,目前所用的环孢菌素制剂与上述胶囊包裹形式的环孢菌素制剂的比较,显示出后者的注射后立即出现的血液峰值水平有5倍的下降。

为了避免与Cremaphor相关的问题,包裹于如上所述

的聚合物外壳内的环孢菌素可通过静注给药。可以将它溶解于一种生物适合性油类或许多其它溶剂。然后通过如上所述的声波处理,将它分散入聚合物外壳内。另外,聚合物外壳包裹的环孢菌素(或其它免疫抑制剂)给药的重要优点是由于肝内网状内皮系统对注射物质的摄取而具有局部定位特点。在一定程度上,由于局部定位特点可避免系统毒性作用并减少有效剂量。在实施例9中描述了静脉给药之后,可将聚合物外壳包裹的紫杉醇有效地输送到肝脏。根据本发明输送环孢菌素(或其他可能的免疫抑制剂)会得到类似的结果。

## 实施例12

### 聚合物外壳的抗体靶作用

本发明的聚合物外壳的特征是可以把单克隆或多克隆抗体附着在聚合物外壳上,或者把抗体结合到聚合物外壳内。当制备聚合物微型胶囊壳时,可以把抗体结合到聚合物外壳内,或者在制备之后将抗体附着在聚合物微型胶囊壳上。可用标准蛋白固定技术来实现这一目的。例如,蛋白质如白蛋白制备的蛋白微型胶囊,白蛋白赖氨酸残基上的大量的氨基基团可以用来附着适宜的改性抗体。例如,制备聚合物外壳时,将抗肿瘤抗体结合到聚合物外壳内;或者在制备之后将抗肿瘤抗体附着在聚合物微型胶囊壳上,从而将抗肿瘤剂输送到肿瘤部位。再如,在制备聚合物外壳时,将抗靶细胞上受体的抗体结合到聚合物外壳内,者在制备之后,将抗

靶细胞上受体的抗体附着在聚合物微型胶囊壳上。使基因产品被传送到特定细胞上(如肝细胞上或骨髓中的某些干细胞上);另外,可用抗核心受体的单克隆抗体将包裹的产品作用于特定细胞类型的细胞核。

### 实施例 13

#### 聚合物外壳作为多核苷酸结构、酶和疫苗的载体

基因疗法作为一个可行性的选择性疗法,越来越被广泛接受(目前,40 多项人基因转移的方案已经被 NIH 和/或 FDA 检查委员会认可)。但实行这种疗法的障碍之一就是人们不愿意使用病毒载体将基因物质导入到人细胞基因组中。病毒本身是具有毒性的,因此,在基因疗法中冒险使用病毒载体,特别是对非致死性、非遗传性疾病的治疗来说是不被接受的。可惜的是,没有利用病毒载体而转移的质粒通常不被导入到靶细胞的基因组中。另外,如同常规药物一样,这种质粒在体内的半衰期是有限的。因此,使用基因疗法(以及反义疗法,它是一种相反形式的基因疗法。其中将核酸或寡聚核苷酸导入来抑制基因表达)的一般限制不能有效地向体内传送核酸或寡聚核苷酸,因为它们太大不能透过细胞膜。

将 DNA、RNA、质粒、寡聚核苷酸、酶等包裹在本发明所述的蛋白微胶囊壳中,可以促进它们向肝、肺、脾、淋巴和骨髓的靶传送。因此,按照本发明,可以将这些生物制品传送到细胞内部而不会伴随有与使用病毒(载体相关的危险性)。

这种类型的制剂可以促进从血流中直接对聚合物外壳的非特异性摄入或者 RES 细胞的摄粒作用。或者通过肌肉注射进入肌肉细胞中,或者通过直接注射进入肿瘤中。另外,可以用抗核心受体的单克隆抗体将包裹产物靶传送到某种细胞类型的细胞核。

用这种结构可以治疗的疾病包括糖尿病、肝炎、血友病、膀胱纤维变性、多发性硬化症、肿瘤、流感、艾滋病等疾病。例如,可以将类胰岛素生长因子基因(IGF-1)包裹在蛋白微囊外壳中给药来治疗糖尿病性外周神经病和恶病质。可以将编码 IX 因子和 VIII 因子(用于治疗血友病)的基因包裹在本发明的蛋白微囊外壳中,以特异性地传送肝脏。同样,可以将低密度脂蛋白(LDL)受体基因包裹在本发明的蛋白微囊壳体中,特异性地传送到肝脏以治疗动脉粥样硬化。

适用于实施本发明的其它基因是那些重新激活机体对癌细胞的免疫反应的基因。例如,由质粒中所含 DNA 编码的抗原,如 HLA-B7,可以加入到本发明的蛋白微囊壳体中,直接注射入癌灶(例如皮肤癌)。一旦进入癌灶,抗原将激发癌特异性细胞,使细胞激活素(如,IL-2)水平升高,它能使肿瘤具有免疫系统所攻击的靶目标。

再如,也可以将含有部分腺相关病毒基因组的质粒包裹到本发明的蛋白微囊壳体中。另外,本发明的蛋白微囊壳体可以用于传送治疗基因到达 CD8<sup>+</sup>T 细胞,作为对各种癌症和感染性疾病的可接受性免疫治疗。

本发明的蛋白微囊壳体还可用作抵抗感染性疾病的给

药系统,来靶传送如抗肝炎 B 病毒的反义核苷酸。这种反义寡聚核苷酸的一例子是一种抗肝炎 B 病毒的聚腺苷酸信号的 21 聚体含磷硫的核苷酸(phosphoro thioate)。

本发明的蛋白微囊壳体还可用来传送囊性纤维变性透膜调节基因(CFTR)。缺乏这种基因的人会发生囊性纤维变性,可以通过喷雾含有 CFTR 基因的本发明的蛋白微囊壳体,并直接吸入肺中来治疗这种疾病。

用本发明的微囊壳体也可以传送酶。例如,可以将酶(DNase)包裹,并通过在聚合物壳体外部连接上合适的抗体而将它靶传送到病毒包裹蛋白或病毒感染的细胞。也可以将疫苗包裹在本发明的聚合物微囊中,并用于皮下,肌肉内或静脉内给药。

#### 实施例 14

用作血红细胞代用品的不溶性血红蛋白结构(HIC)的制备

合成前用乙醇和无菌生理盐水冲洗一个 20ml 玻璃反应皿、钛发生器和垫圈、以及所用的全部仪器。在典型反应中,将 3.5ml 5%w/v 血红蛋白(人或牛的)加入反应皿,连接上超声波发声器(Heat Systems XL2020,20KHz,最大功率 400W)。然后将此发声器和反应皿浸入 55℃的控温槽中,虽然产物可以在较宽的温度范围内(0~80℃)合成,但最佳温度为 55℃,pH 值为 6.8。对于物质的高收率,温度控制是



关键,并且最佳温度依赖于特殊的实验设计。超声波源在功率7位置上开通。利用厂家的列线图推测输出功率大约为 $150\text{W}/\text{cm}^2$ 。在30秒内完成反应。较长或较短的反应时间,其产量都比较少。对于牛血红蛋白来说,使2.5%w/v溶液通过一种Sephadex G-25凝胶渗透柱以除去所有阴离子,如磷酸根。在典型的人血红蛋白IHC的合成中,将超声发生器置于气和水的交界面上。产生的均匀悬浮液含有蛋白质类红细胞。将水悬浮液贮藏于 $4^{\circ}\text{C}$ 的无菌容器内。

典型的反应产生每ml含有大约 $3 \times 10^8$  IHC壳体的溶液,其壳体平均直径3微米,标准误差为1微米。此合成过程产生了高浓度的微米大小的生物物质,其大小分布范围很窄。

合成以后,IHC仍保持为天然蛋白溶液中的悬浮体。为了从未反应的蛋白中分离出IHC,可用如下几种方法:过滤、离心和透析。第1种方法包括过滤混合物,通过一种Anotop注射过滤器,其孔径为 $0.2\mu\text{m}$ (Whatman, Inc.),用几体积的水冲洗过滤器,直到滤液含有很少或不含蛋白(通过UV—可见光谱测定)。IHC被回冲(backwashed)出过滤器,重新悬浮于相同容积的盐水中。第二种纯化过程包括向心或离心过滤器应用,其截止分子量为100KD。离心过滤是一种被滤过膜从中间隔开的离心管。在1000G将IHC溶液离心5分钟,可使大多数未反应的血红蛋白(64.5KD)通过滤过膜。最后,用大分子量(300KD)的滤过膜透析以纯化IHC。然而,此方法需要透析2天左右。纯化IHC的优选方法是应

用向心离心。

### 实施例 15

用作红细胞替代物的不溶性血 32 蛋白/白蛋白结构 (IHAC) 的制备

合成前用乙醇和无菌生理盐水冲洗一个 20ml 玻璃反应皿、钛发声器和垫圈以及所用的全部仪器。在典型反应中, 将 3.5ml 5% m/v 血红蛋白和白蛋白(人或牛的, 血红蛋白/白蛋白比值在 0.5~2 之间)加入反应皿, 连接超声发生器 (Heat Systems, XL2020, 20kHz, 最大功率 400W), 然后将此发声器和反应皿浸入 55℃ 的控温槽中。虽然产物可在较宽的温度范围内 (0~80) 合成, 但在 55℃ 下反应进行最佳。pH 值为 6.8。对于产物的高收率, 温度的控制是关键, 并且最佳温度依赖于特殊的实验设计。超声波源在功率 7 位置上开通, 利用厂家的列线图推测其输出功率大约为 150W/cm<sup>2</sup>。在 30 秒内完成反应。较长或较短的反应时间, 其产量都比较少。所产生的均匀悬浮液中含有蛋白类血红细胞的替代物。含水悬浮液经过过滤、冲洗, 重新悬浮于无菌缓冲盐水中, 并在 4℃ 的无菌容器内贮存。

如上所述, 典型的反应产生每 ml 含有大约 10<sup>8</sup> 个壳体的溶液, 其壳体平均直径为 3 微米, 标准误差为 1 微米。此合成过程产生高浓度、大小分布狭窄的微米大小的生物物质。

还可以利用一种流水线系统, 使 IHC 的生成反应连续

进行。这种系统由蠕动泵组成,它可持续地将血红蛋白流以及任意一种的生物可溶性油或碳氟化物泵入带有声波发声探针的反应皿中。在反应皿中停留一段合适的时间,IHC 通过从反应皿中溢出进入回收罐而得到回收。未反应血红蛋白溶液重新循环进入反应皿中。

### 实施例 16

#### 含有包裹碳氟化物的不溶性血红蛋白结构的制备

合成前用乙醇和无菌生理盐水冲洗一个 20ml 玻璃反应皿、钛发生器和垫圈,以及所用的全部仪器。在典型的反应中,将 3.5ml 5% $m/v$  血红蛋白(人或牛的)加入反应皿,连接超声发声器(Heat Systems XL2020,20KHz,最大功率 400W)。将一种碳氟化物,全氟萘烷 3.5ml,加入反应皿中。然后将此超声发声器和反应皿浸入 20℃ 的控温槽内。此水相 pH 为 6.8。超声波源在功率 7 位置上开通。利用厂家的列线图推测出输出功率大约为 150W/cm<sup>2</sup>。在 30 秒内完成反应。所得的均匀悬浮液中含有在内部包裹有全氟萘烷的交联不溶性血红蛋白壳体的微囊或微球体。此乳状悬浮液经过过滤、冲洗,重新悬浮于上述的无菌缓冲生理盐水中,并在 4℃ 的无菌容器内贮存。

如上所述,典型的反应产生每 ml 含有大约 10<sup>8</sup> 个壳体的溶液,其壳体平均直径为 3 微米,标准误差是 1 微米。此合成过程产生了高浓度、大小分布狭窄的微米大小的生物物

质。

### 实施例 17

#### 含有包裹碳氟化物的不溶性白蛋白结构的制备

合成前用乙醇和无菌生理盐水冲洗一个 20ml 玻璃反应皿、钛发声器和垫圈,以及所有的全部仪器。在典型反应中,将 3.5ml 5%w/v 白蛋白(人或牛的)加入反应皿中,连接超声发声器(Heat Systems XL2020, 20KHz, 最大功率 400W)。将一种碳氟化物,全氟萘烷(或全氟三丙胺)3.5ml 加入反应皿中。然后将超声发声器和反应皿浸入 20℃ 的控温槽内。此水相 pH 为 6.8。超声波源在功率 7 位置上开通。利用厂家的列线图推测出输出功率约为 150W/cm<sup>2</sup>。在 30 秒内完成反应。所得的均匀悬浮液中含有在内部包裹有全氟萘烷(或全氟三丙胺)的交联不溶性白蛋白壳体的微囊或微球体。此乳状悬浮液经过过滤、冲洗,重新悬浮于上述无菌缓冲盐水中,并在 4℃ 的无菌容器中贮存。

如上所述,典型的反应产生每 ml 含有大约 10<sup>8</sup> 个壳体的溶液,其壳体平均直径为 3 微米,标准误差为 1 微米。此合成过程产生了高浓度、大小分布狭窄的微米大小的生物物质。

### 实施例 18

用变构改良剂如 5'-磷酸吡哆醛(PLP)进一步改良的

## 不溶性血红蛋白结构

为获得对氧具有不同亲合力(即不同的  $P_{50}$  的血红蛋白结构,用 IHC 与 PLP(一种已知的变构调节剂)作进一步反应。将三羟甲基氨基甲烷缓冲液中的 IHC(按实施例 14 获得)悬浮液,在  $10^{\circ}\text{C}$  氮气下脱氧。将 10ml 脱氧后的 IHC 悬浮液分别放入 6 个独立的反应皿中。每个反应皿中加入的 PLP/Hb 摩尔比不同,它们是:0.1/3.0,0.75/3.0,1.5/3.0,3.0/3.0,4.2/3.0,6.0/3.0。30 分钟后,加入超过 10 倍量的硼氢化钠,持续 30 分钟以减少席夫碱。然后通过离心过滤此悬浮液,用缓冲盐水回冲 3 次,重新悬浮于缓冲盐水中,并在  $4^{\circ}\text{C}$  下贮存。这种修饰作用于脱氧血红蛋白中  $\alpha$ -珠蛋白链上的氨基末端基因。从这种意义上讲,在稳定脱氧构象方面,此种改性与 2,3-DPG 它连接于赖氨酸 EF6(82)b 上的作用非常相似。

这六种不同程度改性的结果是:IHC 的  $P_{50}$  随着 PLP 取代的增多而递增( $P_{50}$  的递增,也就是氧亲和力的下降)。

## 实施例 19

### 带有血红蛋白和聚乙二醇交联壳体的不溶性结构物

已知聚乙二醇(PEG)对细胞无毒性、无炎症性、无粘连性,通常无生物活性。附着在 PEG 上的蛋白很少发现有抗原性。发现脂质体的循环会因 PEG 的联接或结合而增加。因

此,这种将 PEG 结合入 RBC 中,将会预期地延长循环时间。通过改变加入蛋白(如血红蛋白)的巯基 PEG 的浓度,可制备出具有不同稳定性的 PEG 血红蛋白 RBC。巯基 PEG 可通过现有技术制备(如:Harris 和 Heart Polymer Preprints 32 : 154(1991))。

将分子量为 2000g/mol 的巯基 PEG 以 1% 的浓度(即 0.1g 加入 10ml)溶解于 5% 血红蛋白溶液中。用声波处理这种蛋白—Peg 溶液以生成如实施例 14 中描述的蛋白类红细胞替代物。

#### 实施例 20

带有以共价键附着于壳体外部的聚乙二醇的不溶性血红蛋白结构

按实施例 14 所述制备 IHC。采用文献中(Beauchamp et al. Analytical Biochemistry 131 : 25—33, 1983)的技术,将分子量为 10,000 的聚乙二醇(PEG 10K)与 1,1'-羰基二咪唑(CDI)反应。将 IHC 悬浮于 50mM pH 为 8.0 的硼酸缓冲液中,并且加入 PEG—CDI(超过血红蛋白赖氨酸总量的 2 倍摩尔量),在室温下搅拌反应混合物 6 小时,所得的 PEG—IHC 通过过滤分离,用盐水冲洗,重新悬浮于无菌缓冲盐水中。

#### 实施例 21

### 影响不溶性血红蛋白结构形成的参数

检验几个变量,如蛋白浓度,温度,声处理时间,声强度,pH 值,以获得 IHC 的最佳生成方式。

由 1%,2.5%,5%和 10%的血红蛋白溶液制备这些物质,也可由混和蛋白溶液制备,如血红蛋白和人、牛的白蛋白,其浓度变化为 1—10%。用粒子计数器测定其大小和浓度。发现其大小不随蛋白起始浓度出现有意义的变化。在蛋白自起始浓度至 5%之间时,所得数量随浓度增加而增加。在此浓度以上,其数量没有发现有明显变化。

发现初始试管温度对 IHC 的最佳制备有重要意义。典型初始温度保持在 0—80℃,最佳初始温度为 70℃左右。

超声处理时间也是决定每 ml 产生 IHC 数量的重要因素。超声处理约 30 秒左右,有利于合成高浓度的 IHC。更长或更短的超声处理时间产生足量但较前为少的 IHC。

按照超声发生器厂家提供的列线图,用于此实验的超声发生器的声音功率约为 150W/cm<sup>2</sup>。其它设定功率也可产生大量的 IHC。

### 实施例 22

#### 作为油溶性药物的载体的不溶性血红蛋白结构

几种抗肿瘤药物的细胞毒作用在有氧情况下大大提高。因此,在将药物输送到肿瘤灶的同时,需要提高那个部位的

氧浓度。本发明的血红蛋白微球体具有此作用。上面实施例 16 描述了不溶性血红蛋白壳体对碳氟化物液体的包裹。细胞毒药物,例如环磷酰胺、BCNU、左旋苯丙氨酸氮芥、紫杉醇、喜树碱、阿霉素、鬼臼乙叉甙等等,可被溶解在碳氟化物或其它适宜的油中,例如豆油,并且被包裹于血红蛋白结构内。

以 5mg/ml 的浓度将紫杉醇溶解于豆油(SBO)中,将 3.5ml 5%的血红蛋白溶液加入反应中,然后再加入 3.5ml 的 SBO/紫杉醇。对两相混合物进行如实施例 16 中的声波处理,得到含有 SBO/紫杉醇的交联不溶性血红蛋白壳体。

### 实施例 23

#### 作为水溶性药物的载体的聚合物壳体

几种水溶性药物被选用包裹于聚合物壳体内。例如,将氨基甲叶酸以 5mg/ml 的浓度溶于水中。使用普卢兰尼克-65(聚环氧乙烷和聚环氧丙烷的嵌段共聚物)将每 ml 这种水溶液和 4ml 的豆油一起乳化,形成一种稳定的油包水(w/o)微乳液。在 3.5ml 5%血红蛋白溶液上覆盖 3.5ml 这种 w/o 微乳化液。声处理 30 秒后得到含有包裹的氨基甲叶酸微乳化液的不溶性血红蛋白结构。

### 实施例 24

#### 作为蛋白载体的聚合壳体



几种蛋白被选用包裹于聚合物外壳内,如血红蛋白,白蛋白等等。例如,作为一种增加 IHC 的血红蛋白负荷量的方法,把血红蛋白包裹入 IHC 中,取代实施例 23 中的水溶性药物。将血红蛋白以 10% 的浓度溶于水中。使用普卢兰尼克 (Pluronic)-65 (聚环氧乙烷和聚环氧丙烷的嵌段共聚物) 将 1ml 的这种水溶液与 4ml 的豆油一起乳化,以形成一种稳定的油包水 (w/o) 微乳化液。在 3.5ml 5% 的血红蛋白溶液上覆盖 3.5ml 这种含有血红蛋白的油包水微乳化液。这两相混合物经声波处理 30 秒后得到不溶性血红蛋白结构,这种结构含有本身也含血红蛋白的包裹的微乳化液。这种方法可提高每个 IHC 微球体的血红蛋白总量,因而为结合氧提高了携氧能力。

#### 实施例 25

白蛋白/碳氟化物结构的体内给药——磁共振成像 (19F-MRI) 检测生物分布

按实施例 17 制备含全氟壬烷的白蛋白结构。最后的悬浮液由含 20% 体积的碳氟化物的无菌盐水构成。将 2ml 此悬浮液经尾静脉注入氯胺酮麻醉的 Sprague Dawley 小鼠。通过使用 Bruker 500MHz NMR 仪器以  $^{19}\text{F}$ -MRT 检测碳氟化物的活体分布。将小鼠放入一个 10cm  $^{19}\text{F}$  线圈内使用  $T_1$  加权序列以  $\text{TR}=1$  秒,  $\text{TE}=20$  毫秒和  $256 \times 128$  数据矩

阵而获得影像。

给药后 1 小时发现大多数 FC 蓄积在肝、肺、脾中。一些 FC 也能在骨髓中检测到。在组织定位和蓄积方面,血红蛋白结构有预期的完全相同的作用。这些观察结果对肝、肺肿瘤的治疗,以及在用高剂量氧配合细胞毒药物的定位给药或作为放射治疗的辅助药物治疗骨髓肿瘤细胞方面具有重要的启示。

#### 实施例 26

##### 带有药物的结构的活体给药

按实施例 22 制备含包裹的紫杉醇(在 SBO 中)的不溶性血红蛋白结构,所得的悬浮液由含 20% 体积的 SBO 的无菌盐水构成。将 2ml 此悬浮液经尾静脉注入氯胺酮麻醉的 Sprague Dawley 小鼠中。

注射 2 小时后,处死小鼠,取出肝脏。用少量的盐水使肝脏匀浆,并用乙酸乙酯提取。将提取物冻干,溶于甲醇中并注入到一种 HPLC 柱。从肝中回收了未代谢的起始剂量大约 15% 的紫杉醇。这说明,在向这些部位传递氧的同时将抗肿瘤药物特异性地输送到肝脏是可行的。

#### 实施例 27

##### 作为不溶性血红蛋白血液代用品的稳性血液置换模型

通过颈外静脉,给麻醉的 Sprague—Dawley 小鼠插管。在 10 分钟时间取出其血量的 70% 左右。小鼠保持此状态再经过 10 分钟。然后重新注入一种  $P_{50}$  为 28mmHg 的充氧的 IHC 等渗悬浮液。连续监测小鼠的平均动脉压,心率和呼吸频率。随着时间的推移这些小鼠存活下来。

#### 实施例 28

##### 难溶性血红蛋白对组织局部缺血逆转的作用

对难溶性血红蛋白(IHC)选择性地将氧气传输到局部缺血部位的功能进行研究。具有“高亲合力”,即  $P_{50}$  < 28mmHg 的 IHC 适用于这一目的,因为它们仅在此循环系统中正常碰到氧梯度大的部位,也就是所说的在局部缺血部位释放氧气。将具有  $P_{50}$  为 20mmHg 的 IHC 用于这目的。

用大鼠双侧颈动脉闭塞模型作为“中风”或大脑局部缺血模型。通过临时结扎使氯胺酮麻醉的 Sprague—Dawley 小鼠的两侧动脉闭塞,在对照组中,15 分钟后移去结扎而恢复正常的血液流动。在实验鼠中,用加氧设备使 IHC 混悬液在外部充氧后,直接将 1ml 高亲合力的 IHC 盐水混悬液注入每一侧的颈动脉。治疗 24 小时后,处死小鼠,取出它们的大脑,固定,切片并用氮蓝四唑(NBT)或锥虫蓝染色来测定细胞死亡的程度。通过锥虫蓝染色的测定得知在接受了本发明 IHC 的实验小鼠中细胞死亡程度较低。

## 实施例 29

### 不溶血红蛋白结构在活体循环系统中半衰期的估价

通过外颈静脉向麻醉的 Sprague—Dawley 小鼠(350—400g)插入导管。将相当于 20%动物血容量的 IHC 等渗混悬液注射液通过导管给药。在 0.25 到 92 小时之间的采样时间范围内采血。离心血样并且观察血浆的溶血迹迹象或可溶血红蛋白的出现。由于 IHC 中的“微泡”具有气态的空间(并且因此比水的密度低),它们在离心后上升到血浆的表面。滤除这些微泡,在盐水中重新悬浮,并且用粒子计数器计数。循环系统中 IHC 半衰期就测定出来了。与现有技术的源于血红蛋白的人工血浆代用品相比,发现本 IHC 显示出增加了的循环半衰期。

## 实施例 30

### IHC 的器官保存作用——对大鼠心脏的保藏作用

用外科手术摘除麻醉 Sprague—Dawley 鼠的心脏并利用室内空气对其进行人工呼吸。将心脏浸入具有同 IHC(或 IHC/FC,或白蛋白/FC)保藏基质有相同组分而没有血红蛋白组分的晶体基质(“心脏麻痹基质”——CM)中。心脏用 CM 浸泡几分钟,将其冷却到 10℃。然后用 140ml IHC 保藏基质在 12℃保藏心脏 12 小时。连续以低压(18mmHg)使 IHC 基质通过心脏,并且以 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> 使其持续地平

衡。保藏12小时后,通过使用离体的工作大鼠心脏检测设备检测心脏的收缩、舒张和功能活动

### 实施例 31

利用 IHC 基质在心脏外科手术中进行心脏麻痹

进行心肺分流术,并且在恰当的主动脉交叉关闭和开口之后,将含有 IHC(或 IHC/FC,或白蛋白/FC)的等渗混悬液作为氧载体,在 4℃经团块注射把 500 至 100ml 的团块输送到主动脉根部。向左侧、右侧冠状动脉口输送另外剂量的冷基质,在外科分流术的情况下,在最终的吻合术之前也将介质传输到移植物的末端。每 15 到 20 分钟以足以保持较低的心肌温度的量输送该基质。完成整个操作过程后,移去主动脉夹,使心脏开始恢复温暖。

### 实施例 32

IHC 基质在血管成形术或动脉疏通术(Atherectomy)中的应用

在用来恢复向器官的闭塞或灌注不足区域灌注的介入手术过程中给药 IHC(或 IHC/F,或白蛋白/FC)介质。这种手术的例子有血管成形术或动脉通术。在经皮透腔状血管成形术方法的膨胀充气过程中通过膨胀充气导管的中心腔以大约 60ml/分钟的速度给药充氧的 IHC 基质可以缓解局部

的缺血情况。以体温的温度将这种基质给药,它含有例如生理相容的 Ringer 氏电解质和底物。在每一膨胀充气期间注入一定剂量的氧气平衡的 IHC 基质。还可以在动脉疏通术的充气膨胀阶段使用类似的方法,该手术可用来以刀或激光的形式物理清除血管中的障碍。在酶促溶血过程中把基质直接注入被堵塞的血管能够在堵塞物溶解时为堵塞物提供氧。目前在一些血管成形术过程中使用 Fluosol-DA,本发明的 IHC(或 IHC/FC,或白蛋白/FC)基质能够取代 Fluosol-DA。

### 实施例 33

#### 合成由聚合物外壳包裹的十二氟壬烷( $C_9F_{20}$ )

必须在合成反应进行之前将一个 20ml 的玻璃反应槽、钛制的发声器、套管以及使用的全部设备用乙醇和无菌盐水洗涤干净。在这一典型反应中,将 3.5ml 无菌 5%W/v USP (美国药典标准)人体血清白蛋白(Alpha 医疗公司提供)加入到反应槽中,反应槽连接于超声波发声器(Heat Systems, XL2020, 20KHz, 最大功率 400W)。然后将发声器与槽一起浸入温度恒定在 22℃的水浴中。反应在 22℃进行为最适宜条件,而产品能在更宽的温度范围内(0℃到约 40℃)合成。温度控制是高产量的关键,而最适宜温度条件则依赖于特定的实验条件。

接着加入 6ml 十二氟壬烷( $C_9F_{20}$ ),超声波旋钮旋至第

七挡功率处。加入的碳氟化合物的量可在小于 1ml 到约 13ml 之间变化,这时的蛋白质聚合物外壳产率良好。反应在约 30 秒内完成。反应时间过短和过长产量都会减少。所生产的均匀的混悬液包含由蛋白质聚合物外壳包裹的十二氟壬烷,按体积计算为大致 60% 体积的全氟壬烷。在 4℃ 的无菌容器内保存这一含水混悬液。

典型的反应生产的溶液每 ml 含大致  $1 \times 10^9$  个外壳。平均外壳直径为 2 微米,标准差为 1 微米。观察到这一合成过程生产出高浓度的、大小分布范围较窄的微米大小的生物制品。

#### 实施例 34

合成由聚合物外壳包裹的全氟三丁基胺( $C_{12}F_{27}N$ )或全氟三丙基胺( $C_9F_{21}N$ )

将 5%w/v USP 的人体血清白蛋白(3.5ml)和氟胺化合物(6ml)加入到玻璃反应槽中并用高强度的超声波辐射,反应条件是功率定在第 7 档,水浴温度为 22℃,反应时间大致在 30 秒。又一次合成了高浓度的由蛋白质聚合物外壳包裹的高浓度的全氟三丙基胺 $[(C_3F_7)_3N]$ 和全氟三丁基胺 $[(C_4F_9)_3N]$ ( $1 \times 10^9$  个外壳/ml),外壳平均直径为 2 微米。

#### 实施例 35

合成由聚合物外壳包裹的全氟萘烷( $C_{10}F_{18}$ )

将 5%w/vUSP 的人体血清白蛋白(3.5ml)和全氟萘烷( $C_{10}F_{18}$ ;6ml)加入到玻璃反应槽中,并用高强度的超声波辐射。反应条件为功率定在第七挡,水浴温度为 22℃,反应时间大致在 30 秒。合成了由蛋白质聚合物外壳包裹的高浓度、大小分布范围较窄的全氟萘烷。此外,由于全氟萘烷和全氟三丙基胺都是 FDA 批准的碳氟化合物,Fluosol DA 的主要成分,因此将这些化合物用于医学成像很容易被管理机构所认可。

#### 实施例 36

合成由聚合物外壳包裹的全氟 15—冠—5( $C_{10}F_{20}O_5$ )

将 5%w/vUSP 的人体血清白蛋白(3.5ml)和氟冠醚( $C_{10}F_{20}O_5$ ;6ml)加入到玻璃反应槽中,并且用高强度的超声波辐射。反应条件定在功率的第七挡,水浴温度为 22℃,反应时间大致在 30 秒。同前,合成了高浓度的由蛋白质聚合物外壳包裹的氟冠醚,其颗粒大小分布较窄。事实上这一合成由聚合物外壳包裹的碳氟化合物的实验过程是典型的所有碳氟化合物的研究方法。

#### 实施例 37

合成由聚合物外壳包裹的全氟—叔丁基丁烯( $C_{10}F_{18}H_2$ )



将 5%w/v USP 的人体血清白蛋白(3.5ml)和  $C_{10}F_{18}H_2$  (6ml)加入到玻璃反应槽中,并用高强度的超声波辐射,功率定在第七挡,水浴温度为 22℃和反应时间大致在 30 秒。通过这一过程,能够合成由蛋白质聚合物包裹的高浓度的全氟—叔丁基丁烯。

### 实施例 38

#### 由聚合物外壳包裹的碳氟化合物的毒性

在 10 分钟内给五只大鼠通过外插的静脉导管注射 5ml 2%v/v 碳氟化合物混悬液(由 HSA 蛋白质聚合物外壳包裹的全氟壬烷)。一般的碳氟化合物由于其牢固的氟—碳键而没有毒性;的确,碳氟化合物已经被成功地用作 FDA 批准的人工血浆代用品(Fluosol DA)。在特定的时间收集大鼠并且解剖。除了观察大鼠的一般性健康之外,要仔细检查肝、脾、肺和肾。在 0.5, 2, 8 和 24 小时检查时大鼠都是健康的,没有发炎的组织或器官。90 天后第五只大鼠仍然存活,而且仍很健康。作为对照组,这一 FDA 批准的大鼠体内豆油的用量为半数致死量,进一步证实了碳氟化合物是无毒的和安全的。

### 实施例 39

纯碳氟化合物和由聚合物外壳包裹的碳氟化合物的  $^{19}F$

## 核磁共振光谱

由蛋白质聚合物外壳包裹的碳氟化合物和纯碳氟化合物的 NMR 光谱可以在 Bruker 500MHz NMR 光谱仪上获得。仪器调到  $^{19}\text{F}$ ，它的共振频率为 470.56MHz。用氘溶剂作为阻断剂，并且所有光谱都以在 0 ppm 的 Freon ( $\text{CCl}_3\text{F}$ ) 为客观的参考标准。将全氟壬烷和  $\text{CDCl}_3$  放入 5mm NMR 试管中。纯全氟壬烷的光谱得到两组尖峰，一组在 -87ppm，第二组在 -127, -128 和 -133ppm。

由 HSA 蛋白质聚合物外壳包裹的全氟壬烷混悬液在  $\text{D}_2\text{O}$  中重新混悬，并且获得了类似的 NMR 光谱。从 20%v/v 碳氟化合物混悬液得到强的信号，其峰值或共振频率是在 -81, -121, -122 和 -126ppm 处。由聚合物外壳包裹的碳氟化合物在超声波辐射期间没有引起全氟壬烷化学或结构的改变。例如，对于  $\text{C}_9\text{F}_{20}$  分别观察到两组共振频率：一组相应的是在大约 -80ppm，第二组共振频率大致在 -125ppm，与  $\text{CF}_2$  基团相符合。

### 实施例 40

#### 利用碳氟化合物的 $^{19}\text{F}$ 核磁共振光谱测定局部温度

在 Bruker 500MHz NMR 光谱仪上测得碳氟化合物的可变温度 NMR 光谱。仪器调整至  $^{19}\text{F}$ ，它的共振频率为 470.50Hz。用氘溶剂( $\text{d}_6$ —二甲基亚砷 [ $\text{d}_6$ —DMSO])作为

阻断剂,并且所有光谱以在 0ppm 的 Freon( $\text{CCl}_3\text{F}$ )为客观的参考标准。全氟十二烷的熔点为  $77^\circ\text{C}$ ,将它与  $\text{d}_6$ -MDSO 一同在室温下放入 5mmNMR 试管。在不同的温度下检测到氟的光谱,并测量其谱线宽度,将 -81ppm 处的谱线宽度以温度的函数形式表述如下:

<u>-81 ppm (Hz)的谱线宽度</u>	<u>温度(<math>^\circ\text{C}</math>)</u>
51.1	102
57.0	82
64.65	60

随着温度上升,低温时的宽谱开始变尖锐,这是由于全氟十二烷正处于从固态到液态的相变阶段。这种变化随着温度变化而尖锐、迅速变化,如同纯物质所测得的结果。

为了减低熔点温度、加宽熔点温度范围,在全氟十二烷中加入(约 2%v/v)的戊烷。如上所示,在全氟十二烷从固态向液态相变阶段,低温时的宽峰变尖锐了。全氟十二烷/戊烷混合物的谱线宽度作为温度的函数表示如下:

<u>谱线宽度(Hz)</u>		<u>温度(<math>^\circ\text{C}</math>)</u>
<u>-82ppm</u>	<u>-123.3ppm</u>	
21.26	87.17	77
165.89	280.50	67
216.6	341.2	57
290.77	436.15	47
578.27	451.33	37
577.62	525.11	27

全氟十二烷/戊烷混合物具有所要求的有较宽范围的低熔点。使用这一系统,可在 27°C 至 77°C 范围内进行温度测定。因此,只要给出一个谱线宽度值,就能测定当时的温度。

举例来说,利用这种技术测量活体的局部温度,包括注射含有碳氟化合物混合物(如上所述)的蛋白质外壳,该混合物的宽的熔化相变过程具有温度——谱线宽度的相互关系(能从实验中获得)。这种制剂除了可以作为<sup>19</sup>F MRI 的对比剂之外,它可以作用于肝脏和脾脏,因此同时可用测定器官内的局部变化温度(以阐明组织内明显异常的病理状态)。

#### 实施例 41

##### <sup>19</sup>F 核磁共振模型图象

将两种类型的聚合物外壳包裹的碳氟化合物用于这种模拟成像的研究。按照如实施例 33 和 34 所述合成由 HSA 蛋白质聚合物外壳包裹的全氟壬烷和全氟三丁基胺。用盐水稀释合成的每个体积含 60% 碳氟化合物的混悬液,然后取 2ml 放入聚苯乙烯试管。将这些聚苯乙烯管放入商业上可得到的在 1.5 特斯拉下工作的 Siemens 2T MRI 仪器(10cm<sup>19</sup>F 线圈)。在 5 分钟时间内以 10 毫秒的回声时间(TE)和 300 秒的重复时间(TR)(256×256 矩阵)获得试管的<sup>19</sup>F 核磁共振图象。

##### 聚合物外壳包裹的全氟壬烷

<u>稀释</u>	<u>[浓度], M</u>	<u>成象清晰度</u>
-----------	----------------	--------------

1	1.8	极佳
1/2	0.9	极佳
1/4	0.45	较好
1/10	0.18	较好
1/50	0.09	较好
1/100	0.02	勉强

良好的 MR 模拟成象甚至在低浓度的由聚合物外壳包裹的全氟壬烷情况下就可观测到。也可以在由聚合物外壳包裹的全氟三丁基胺中观测到非常接近的数值。仅在高稀释度 (1/100; 0.02M) 时成象质量和分辨率较差。

#### 实施例 42

##### 离体肝脾的<sup>19</sup>F 核磁共振成象

向 300g 大鼠体内注射 2ml 20%v/v 由 HSA 蛋白质聚合物外壳包裹的全氟壬烷混悬液。分别在 2 小时后和 5 天后处死大鼠,摘除肝、脾、肾和肺。例如,将整个儿肝脏立即放入一个 4 特斯拉的 MRI 仪器,使用一只 10cm 的<sup>19</sup>F 线圈工作。使用 T<sub>1</sub> 加权序列且 TR=1 秒,TE=20 毫秒,数据矩阵为 256×128(即,128 个相编码步骤,16 个信号平均值)获得肝、脾和肾的<sup>19</sup>F 磁共振图像。

肝脏的<sup>19</sup>F MRI 图象表现出与肝脏吸收聚合物外壳的可变度有关的局部可变强度。例如,可以观察到与门静脉相应的暗区,在该区域看不到聚合物外壳包裹的全氟壬烷出

现,因为多数壳体都集中在肝的 RES 细胞内。

在注射两小时后扫描的肝脏平均成象强度大约比注射五天后扫描记录的成象强度高 20—30%。这表明可能由于聚合物外壳的破裂而使部分全氟壬烷弥散了。总之,获得了表现肝脏形态的高质量的成象。表明这一技术在诊断以及定位肝脏内部异常病理改变方面的可行性。

#### 实施例 43

##### 体内肝、脾的<sup>19</sup>F 核磁共振成象

在 10 分钟内给 150g 的大鼠注射 2ml 20%v/v 由 HSA 聚合物外壳包裹的全氟壬烷(C<sub>9</sub>F<sub>20</sub>)。然后将大鼠置于 4 特斯拉 MRI 仪器内,使用 10cm <sup>19</sup>F 线圈工作。在收集图象前用氯胺酮麻醉大鼠。用 T<sub>1</sub> 加权序列和 TR=1 秒,TE=20 毫秒,以及数据矩阵 256×128(即 128 个相编码步骤,16 个信号平均数)来获得整个大鼠和单个器官如肝、脾和肾的<sup>19</sup>F 磁共振图像。

分别在注射由 HSA 蛋白质聚合物外壳包裹的全氟壬烷 15 分钟,2 小时和 24 小时后使大鼠成象。总之,获得了表现肝和脾形态的高质量成象,表明了这一技术在诊断以及定位含肝脏 RES 的器官内异常病理改变可行性。

#### 实施例 44

##### 利用体内<sup>19</sup>F 核磁共振成象测定局部温度

在 10 分钟内给 300g 的大鼠注射 5ml 20%v/v 由 HSA 聚合物外壳包裹的全氟壬烷/2% 戊烷(或全氟十九酸和 1% 胆固醇)。然后将该鼠放入 15cm 线圈内(Siemens 1.5 特斯拉 MRI 磁共振机)。以 TE 为 10 毫秒和 TR 为 300 秒来收集成象(256×256 矩阵)。在采集数据前用氯胺酮麻醉大鼠。在 15 分钟时间内以 5 毫米的片厚使肝、脾成象。用加热垫包住温和的大鼠,分别在室温和约 37℃ 时采集数据。

#### 实施例 45

利用<sup>19</sup>F 核磁共振成象进行体内氧测定

在 10 分钟内给 300g 的大鼠注射 5ml 20%v/v 由 HSA 聚合物外壳包裹的全氟壬烷。然后将大鼠放入 16cm 线圈中(Siemens 1.5 特斯拉 MRI 磁共振机)。以 TE 为 70 毫秒和 TR 为 3 秒来收集成象(256×256 矩阵)。在采集数据前将大鼠放入一可控制装置中。首先将大鼠放入氧气室以增加氧气的新陈代谢,然后收集谱线宽度和成象。下一步给大鼠注射氯胺酮以减少氧气的消耗量,并再一次收集谱线宽度和成象,观察到谱线宽度和成象强度发生改变,这与大鼠体内溶解氧的含量一致。在较高的氧浓度下测到最大的谱线宽度。用 5 毫米厚的片使肝脾在 15 分钟后成象。用加热垫包住麻醉鼠,分别在室温和 37℃ 时采集到两组数据。

## 实施例 46

### 制备紫杉醇颗粒

用球磨机研磨紫杉醇晶体(Sigma Chemical)直到获得低于 10 微米粒度的紫杉醇固体颗粒。将颗粒悬浮于等渗盐水中,并借助粒子计数器(Elzone, Particle Data)计数来测定其颗粒大小。继续研磨直到颗粒的粒度 100%均低于 5 微米。用于静脉输液的优选粒度是低于 5 微米,最理想的是低于 1 微米。

另外还可通过在水中紫杉醇混悬液进行声处理直到所有颗粒粒度低于 10 微米而获得紫杉醇颗粒。

通过向紫杉醇乙醇溶液中加水直至得到混浊液而使紫杉醇从其乙醇液中沉淀出来,也能获得低于 10 微米的紫杉醇颗粒,也可以在加水过程中对紫杉醇溶液进行声处理,直到获得混浊液。对最终的混合液进行过滤和干燥,就获得了理想粒度的纯紫杉醇颗粒。

通过对溶于挥发性有机溶剂如乙醇的紫杉醇溶液进行喷雾干燥可制备优质的紫杉醇颗粒。使溶液流过超声喷嘴形成含乙醇的紫杉醇液滴。随着乙醇在喷雾干燥器中蒸发,得到优质紫杉醇颗粒。可通过改变紫杉醇乙醇液的浓度、调节流过喷嘴的液体流速和声处理强度而改变粒度。

## 实施例 47

### 合成附着于聚阴离子的顺磁性阳离子



举例来说,经过把藻酸盐分散到二氯化钆( $\text{GdCl}_3$ )溶液中,可实现藻酸钆的合成,例如,可以通过对含钆离子(如, $\text{GdCl}_3$ )的溶液进行超声波辐射和加入少量藻酸钠溶液来合成适于细胞内注射的小球型藻酸钆。将藻酸盐分散到钆离子溶液中,经超声波辐射和多价钆离子的交联。产生微米粒度的藻酸钆颗粒。除了使用超声波辐射以外,也能应用低或高速混合法。

或者,将藻酸钠溶液覆盖在不相混溶的有机溶剂或油(例如:豆油、葵花油、甲苯,二氯甲烷,氯仿以及类似物)上或被其覆盖,使液体接受超声波辐射,并由此使含藻酸盐水相分散到有机相中,然后加入多价离子溶液(例如: $\text{GdCl}_3$ ,  $\text{MnCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$  以及类似物)。因此藻酸钠被交联,产生出适合于在血管内注射后作MRI对比剂使用的极小的藻酸钆球型粒子。可使用任何基本的合成技术用藻酸盐和多价阳离子用来制造球体,纤维,平片等等。

本发明以其特定优选的实施例进行了具体介绍,应当指出,任何修改和变化都在所描述的和权利要求的范围之内。

说明书附图

---

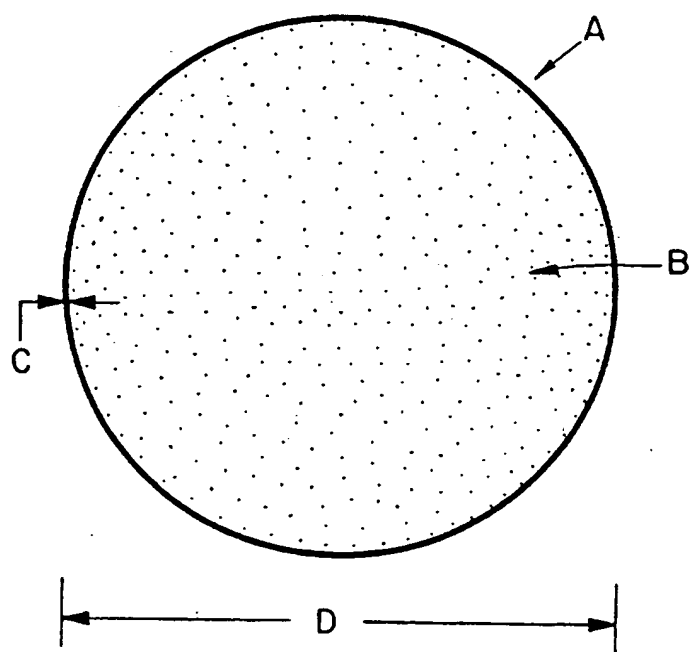


图 1

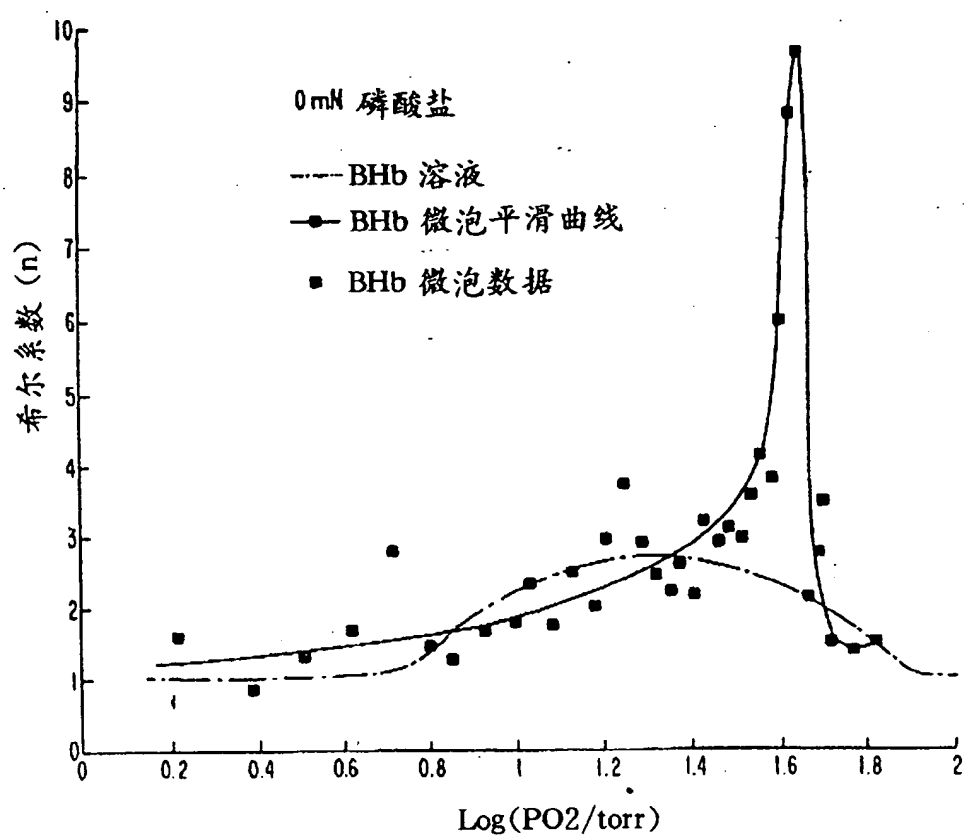


图 2

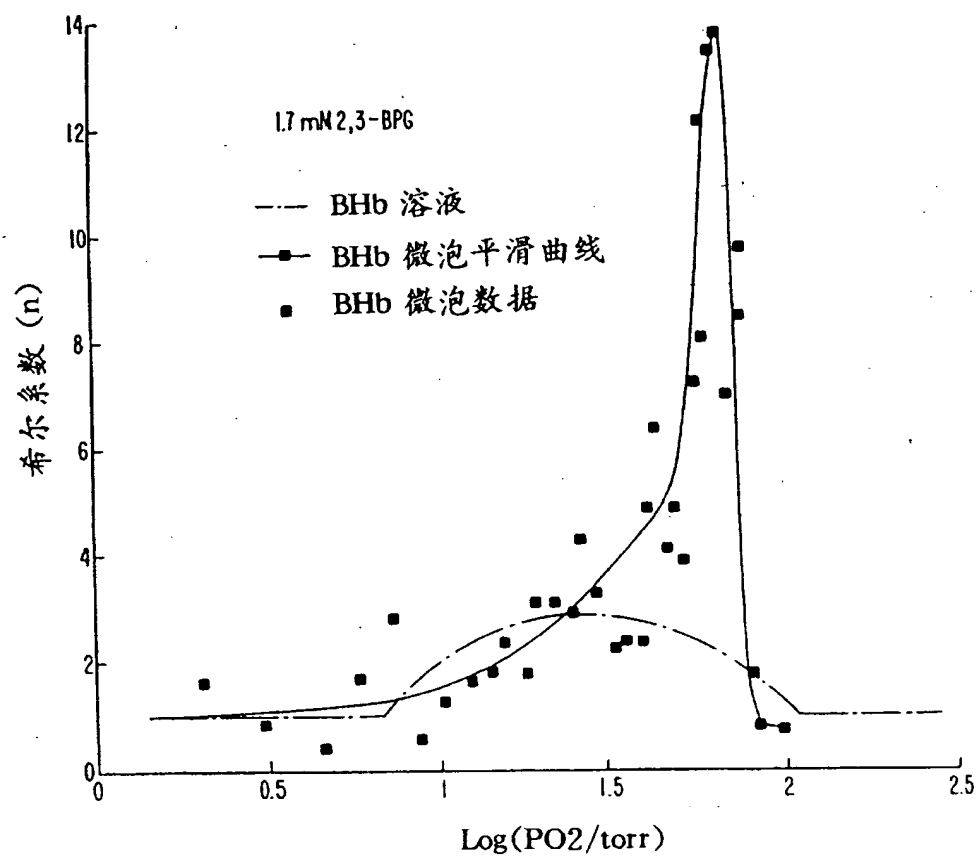


图 3